SÉRGIO PODGAEC

**Padrões de resposta imune em pacientes com
endometriose**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Medicina**

**Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão**

SÃO PAULO

2006

Aos meus pais, Ismael e Clara, meu
respeito e gratidão pelo exemplo e
carinho

À Paola, meu amor profundo, porto
seguro em nossa caminhada

À Carolina, a luz da nossa vida

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Mauricio Simões Abrão, presente desde o início de minha vida profissional, sempre com bons conselhos e orientações, um exemplo de dedicação e amizade

Ao Doutor Ricardo Manoel de Oliveira, pela orientação e auxílio na execução deste estudo

À Professora Doutora Ângela Maggio da Fonseca, pelo incentivo de vários anos e pela oportunidade de realizar desta tese

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

Ao Doutor João Antônio Dias Júnior, pela disposição em trabalhar e discutir caminhos em benefício do crescimento de nosso grupo

Aos Doutores Midgley Gonzáles, Rosa Maria Neme, Flávia Fairbanks e Dani Eisenberg, por participarem do atendimento ambulatorial e dos procedimentos cirúrgicos essenciais para a coleta de dados deste estudo

Ao Professor Doutor Luiz Vicente Rizzo, pela disponibilidade em ensinar e incentivar o estudo da imunologia

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Pereira de Bragança, pelo auxílio na análise estatística

Às pacientes, colaboradoras fundamentais para a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras e gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	15
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	52
7. ANEXOS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
Apêndice.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Grupo de pacientes com endometriose
ASRM – American Society for Reproductive Medicine
AVC – Acidente vascular cerebral
B – Grupo de pacientes sem endometriose
C3 – Fração C3 do complemento
C4 – Fração C4 do complemento
CHP – Complexo de histocompatibilidade principal
ELISA - Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE – Hematoxilina-eosina
HIV – vírus da imunodeficiência humana
IFN-gama – Interferon-gama
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
kDa – Kilodalton
LES – Lupus eritematoso sistêmico
MMP – Matriz metaloproteinase
mRNA – RNA mensageiro
OMS – Organização Mundial de Saúde
n – Número de pacientes
pg/ml – Picograma por mililitro
Th – Linfócito T helper (ou T auxiliador)
Th1 – Resposta imune do tipo Th1
Th2 – Resposta imune do tipo Th2
TNF-alfa – Fator de necrose tumoral-alfa
TGF – Fator de crescimento tecidual
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Padrões de resposta imune Th1 e Th2 (adaptado de Benjamini et al., 2002).....	10
Figura 2: Estadiamento da endometriose proposto pela <i>American Society for Reproductive Medicine</i> (1996).....	21
Figura 3a: Foco de endometriose estromal em meio à fibrose (Hematoxilina eosina, HE - 100x).....	23
Figura 3b: Foco de endometriose, padrões estromal e glandular bem diferenciado (HE - 400x).....	23
Figura 3c: Endometriose de padrões estromal e glandular indiferenciado (HE-400x).....	23
Figura 3d: Endometriose de padrões estromal e glandular misto de diferenciação (HE – 100x).....	23
Figura 4: Aparelho de citometria de fluxo utilizado no estudo (BD FACSCalibur).24	
Gráfico 1: Comparação da média de idade das pacientes do Grupo A (com endometriose) em relação às pacientes do Grupo B (sem endometriose).....	26
Gráfico 2: Análise da gravidade do quadro clínico referido pelas pacientes com endometriose em relação à gravidade da doença confirmada em procedimento cirúrgico.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das 65 pacientes do Grupo A (com endometriose) e das 33 pacientes do Grupo B (sem endometriose), analisadas de acordo com a fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.....	27
Tabela 2: Mediana das concentrações séricas e do fluido peritoneal das citocinas (pg/ml) das pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B).....	29
Tabela 3: Descrição dos níveis de significância da relação entre as concentrações séricas das citocinas envolvidas na resposta Th1 (TNF-alfa, IFN-gama e IL-2) e na resposta Th2 (IL-4 e IL-10) nas pacientes dos grupos com e sem endometriose (Grupos A e B, respectivamente).....	30
Tabela 4: Descrição dos níveis de significância da relação entre as concentrações do fluido peritoneal das citocinas envolvidas na resposta Th1 (TNF-alfa, IFN-gama e IL-2) e na resposta Th2 (IL-4 e IL-10) nas pacientes dos grupos com e sem endometriose (Grupos A e B, respectivamente).....	30
Tabela 5: Comparação das medianas das concentrações séricas das citocinas (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.....	31
Tabela 6: Comparação das medianas das concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.....	31
Tabela 7: Comparação das medianas das concentrações séricas das citocinas (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com estadiamento (ASRM, 1996), local de acometimento e classificação histológica da endometriose.....	33
Tabela 8: Comparação das medianas das concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com estadiamento (ASRM, 1996), local de acometimento e diferenciação histológica da endometriose.....	34

Podgaec S. **Padrões de resposta imune em pacientes com endometriose [tese]**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 78p.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi analisar a relação e a predominância dos padrões de resposta imune Th1 e Th2 em pacientes com endometriose.

Pacientes e Métodos: Entre Fevereiro de 2004 e Abril de 2005 foram avaliadas 98 pacientes divididas em dois grupos de acordo com a presença (Grupo A) ou ausência de endometriose (Grupo B), confirmada histologicamente. Foram coletados sangue periférico e fluido peritoneal de todas as pacientes para a dosagem de interleucinas (IL) 2, 4 e 10, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e interferon-gama (IFN-gama) por citometria de fluxo., Além da presença da endometriose, foram analisadas a fase do ciclo menstrual, o quadro clínico, o estadiamento, o local de acometimento e a classificação histológica da moléstia.

Resultados: Observou-se elevação estatisticamente significativa nas concentrações de IFN-gama (mediana de 1,5pg/ml no Grupo A e de 0,4pg/ml no Grupo B, $p=0,03$) e de IL-10 (mediana de 38,6pg/ml no Grupo A e de 15,7pg/ml no Grupo B, $p=0,03$) do fluido peritoneal das pacientes com endometriose em relação às aquelas sem a doença. As pacientes com endometriose apresentaram alteração estatisticamente significativa na relação das concentrações de IL-4/IFN-gama ($p<0,001$), IL-4/IL-2 ($p=0,006$), IL-10/IFN-gama ($p<0,001$) e IL-10/IL-2 ($p<0,001$) do fluido peritoneal, com concentrações mais elevadas da IL-4 e da IL-10, o que reflete o predomínio da resposta Th2 sobre a Th1.

Conclusão: Os resultados obtidos permitem concluir que, neste estudo, observou-se elevação de citocinas relativas à resposta imune Th2, denotando haver um predomínio deste padrão de resposta em pacientes com endometriose.

Descritores: endometriose, imunologia, citocinas, células Th1, células Th2

Podgaec S. **Immune response patterns in patients with endometriosis [thesis]**. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 78p.

SUMMARY

Objective: The objective of this study was to analyze the relation and the predominance of the immune response patterns Th1 and Th2 in patients with endometriosis.

Patients and Methods: Between February 2004 and April 2005, 98 patients were evaluated and divided into two groups, according to the presence (Group A) or absence of endometriosis (Group B), confirmed by histology. Peripheral blood and peritoneal fluid were collected from all patients to obtain the concentrations of interleukines (IL) 2, 4 and 10, tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interferon-gamma (IFN-gamma) using flow cytometry. Besides the presence of endometriosis, we analyzed phase of menstrual cycle, clinical complaints, classification, site and histological differentiation of the disease.

Results: We observed higher concentrations of IFN-gamma (median of 1.5pg/ml in Group A and 0.4pg/ml in Group B, $p=0.03$) and IL-10 (median of 38.6pg/ml in Group A and 15.7pg/ml in Group B, $p=0.03$) in peritoneal fluid of patients with endometriosis in relation to those without the disease. Patients with endometriosis presented a significant alteration in IL-4/IFN-gamma ($p<0.001$), IL-4/IL-2 ($p=0.006$), IL-10/IFN-gamma ($p<0.001$) and IL-10/IL-2 ($p<0.001$) ratio concentrations of peritoneal fluid, with IL-4 and IL-10 predominance, reflecting a Th2 response predominance over the Th1.

Conclusion: The results allow concluding that, in this study, it was observed a cytokine elevation related to Th2 immune response, indicating a predominance of this pattern of response in patients with endometriosis.

Key words: endometriosis, immunology, cytokines, Th1 cells, Th2 cells

1. INTRODUÇÃO

A endometriose se caracteriza pela presença de glândula e/ou estroma endometriais em áreas extra-uterinas, localizando-se principalmente nos ovários e nos ligamentos útero-sacos (Metzger & Haney, 1989), comprometendo cerca de 10 a 15% das mulheres durante a menacme (Eskenazi & Warner, 1997).

A importância da afecção reflete-se na quantidade crescente de pesquisas publicadas nos últimos 20 anos, destacando-se, em especial, a busca contínua pelo esclarecimento de sua patogênese, pois ao se entender o motivo do desenvolvimento do foco de endometriose, será possível direcionar esforços para melhorar as formas atuais de diagnóstico e tratamento (Giudice & Kao, 2004). Neste contexto, duas correntes principais de hipóteses etiopatogênicas são citadas há quase um século, com suas respectivas atualizações.

A primeira delas é denominada teoria da metaplasia celômica, segundo a qual ocorreria transformação de mesotélio em tecido endometrial (Meyer, 1919). Revendo esta teoria, Zheng et al., em 2005, avaliaram 110 casos de endometriose ovariana e 30 ovários sem endometriose por meio de análise imuno-histoquímica, com especial ênfase às áreas de endometriose inicial, definida pela transição de ovário normal para focos de endometriose. Nestas, o número de células positivas para um marcador de célula estromal endometrial foi significativamente mais elevado do que nas células dos ovários normais, porém, mais baixo do que nas áreas de endometriose bem estabelecida. Esses dados sugerem que as áreas de transições de ovários normais para os focos de endometriose inicial são sedes de processos de metaplasia, tanto no componente epitelial como no estromal.

A hipótese mais conhecida é a teoria da menstruação retrógrada, segundo a qual haveria implante de células endometriais provenientes do refluxo do sangue menstrual pelas tubas uterinas para a cavidade abdominal (Sampson, 1927). Este implante ocorreria pela influência de um ambiente hormonal favorável e de fatores imunológicos que não eliminariam essas células deste local impróprio (Weed & Arquembourg, 1980, Missmer & Cramer, 2003, Siristatidis et al., 2006).

A partir da observação de diversos aspectos desta afecção, Nisolle e Donnez, em 1997, lançaram um conceito que dividiu a endometriose em três

doenças distintas: peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal, esta última denominada de endometriose infiltrativa profunda (Koninckx & Martin, 1992). Segundo estes autores, a doença peritoneal se caracteriza pela presença de implantes superficiais no peritônio; a ovariana inclui os implantes superficiais de ovário e os cistos típicos da doença, os endometriomas; e a endometriose profunda acomete as regiões retro-cervical e para-cervical, o septo reto-vaginal, o reto-sigmóide, os ureteres e a bexiga, de forma infiltrativa, com lesões de profundidade maior do que cinco milímetros (Cornillie et al., 1990).

Os sintomas característicos das pacientes com endometriose são dor pélvica, infertilidade e alterações dos hábitos intestinais e urinários durante o período menstrual (Podgaec & Abrão, 2004). No entanto, apesar de diversas pesquisas tentarem encontrar métodos laboratoriais que permitissem o diagnóstico da moléstia sem a necessidade de um procedimento cirúrgico (Abrão et al., 1997, Podgaec, 2000, Bedaiwy et al., 2002, Khan et al., 2006), o diagnóstico definitivo ainda depende de métodos invasivos, como a vídeo-laparoscopia, que torna possível a visualização das lesões sugestivas da doença e a obtenção de amostra tecidual que confirme, pela análise histológica, essa suspeita.

Durante o procedimento cirúrgico, aplica-se a classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1986), que divide a endometriose em quatro estádios. A gravidade progride com a quantidade e tamanho dos focos de doença e com a presença de aderências, sendo o estágio IV o mais avançado. Os dados histológicos podem ser descritos de acordo com a similaridade com o endométrio típico, conforme estudo de nosso serviço, que identificou a possibilidade de relacionar estas informações com o prognóstico de cada caso (Abrao et al., 2003).

Considerações sobre o papel do sistema imunológico na endometriose

Diversos autores se dedicaram ao estudo da participação do papel do sistema imunológico na endometriose, tendo sido detectadas uma série de anormalidades (Berkkanoglu & Arici, 2003). O principal raciocínio percorrido até

então, atualiza a teoria do refluxo menstrual, no sentido de que as células endometriais que penetram na cavidade peritoneal deveriam ser eliminadas pelos participantes do sistema de defesa do organismo, pois tais células não pertencem a este local. Nas mulheres com endometriose, este mecanismo sofreria um viés e esta varredura não ocorreria de forma correta, o que permitiria o implante e o desenvolvimento dessas células na cavidade peritoneal, dando origem ao foco endometriótico inicial (Harada et al., 2001).

Habitualmente, as células endometriais, mantendo-se na cavidade peritoneal, são identificadas como antígenos que devem ser submetidos à resposta imune local. Dentre outras células, os macrófagos agem como células apresentadoras de antígeno, ao fagocitarem, processarem e apresentarem os antígenos aos linfócitos T. Esta apresentação ocorre através das moléculas codificadas pelo complexo de histocompatibilidade principal (CHP) presentes em sua superfície celular. Existem moléculas de classe I e II do CHP, sendo que o antígeno pode se ligar a qualquer uma destas moléculas. Ao haver a ligação do antígeno à molécula de classe I, ocorre atração de linfócitos T citotóxicos e, quando a ligação se completa à molécula de classe II, ocorre atração de linfócitos T *helper* (auxiliadores). Após esta etapa, é possível afirmar que os linfócitos T citotóxicos liberam substâncias letais, responsáveis pela morte da célula-alvo. De forma distinta, os linfócitos T *helper* não possuem esta ação direta, mas secretam citocinas que podem levar à morte celular (Benjamini et al., 2002). Alterações na atuação de linfócitos, macrófagos e citocinas podem estar envolvidas na gênese da endometriose (Harada et al., 2001).

Imunidade celular

Macrófagos: os macrófagos peritoneais são as principais células da cavidade peritoneal e constituem importante fonte de produção de citocinas, incluindo as interleucinas (IL) 1, 6, 8 e 10, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), o fator de crescimento tecidual beta (TGF-beta) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Oosterlynck et al., 1994; McLaren et al., 1996; Bedaiwy et al., 2002). A função fagocítica dos macrófagos é vasta, graças a

receptores de superfície presentes nestas células e ao poder regulatório de diversos fatores como citocinas, glicocorticóides, lipopolissacárides, fatores estimuladores de colônias de macrófagos e retinóides. Como algumas citocinas parecem estar presentes em níveis anormais no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, esta ação dos macrófagos pode apresentar falhas, o que contribuiria para o desenvolvimento da doença (Lebovic et al., 2001). No fluido peritoneal das pacientes com endometriose, os macrófagos peritoneais parecem estar elevados em número, concentração e estado de ativação (Ulukus & Arici, 2005).

Células *Natural Killer*: as células *natural killer* (NK) participam dos mecanismos que regulam o *clearance* de células endometriais regurgitadas para a cavidade peritoneal, porém, os estudos relativos a este tópico são ainda conflitantes. O número ou a porcentagem de células NK em mulheres com endometriose pode estar diminuído (Ota et al., 2002), aumentado (Hill et al., 1988, Matsubayashi et al., 2001), inalterado (Oosterlynck et al., 1991) ou variável, de acordo com o estágio (ASRM, 1986) da doença (Dias Jr et al., 2005).

Desta forma, um fato que permitiria às células endometriais que se depositam retrogradamente na cavidade peritoneal se implantarem, residiria na diminuição do poder de citotoxicidade das células NK contra o tecido endometrial (Wilson et al., 1994). Esta condição se basearia no aumento da expressão dos receptores inibitórios killer nas células NK peritoneais de mulheres com endometriose, pois, esses receptores são os responsáveis pela inibição da ação citotóxica destas células (Wu et al., 2000).

Linfócitos: os estudos relativos ao número de linfócitos presente em mulheres com endometriose não são conclusivos. Já foi demonstrado haver diminuição na proliferação de linfócitos no sangue periférico na resposta ao reconhecimento de antígenos endometriais (Steele et al., 1984), aumento do número de linfócitos T *helper* no sangue periférico de mulheres com endometriose (Badawy et al., 1987) e concentrações normais de linfócitos no sangue (Hill et al.,

1988) e no endométrio tópico em mulheres com endometriose (Mettler et al., 1996).

Citocinas: são proteínas de baixo peso molecular que atuam como mensageiros do sistema imunológico e reguladores da atividade das diferentes células deste sistema. Estão envolvidas em várias etapas da resposta imune, como quimiotaxia e estímulo à mitose, à angiogênese e à diferenciação celular. Neste grupo estão incluídas, entre outras substâncias, 31 interleucinas, VEGF, TNF-alfa, interferon-gama (IFN-gama) e TGF-beta (Harada et al., 2001).

Há indícios do envolvimento de citocinas em diferentes etapas da patogênese da endometriose, como: migração de macrófagos na cavidade peritoneal; estímulo à adesão da célula estromal à fibronectina, favorecendo o implante peritoneal; adesão da célula endometrial ao peritônio por ação das enzimas matriz metaloproteinases (MMPs) que degradam a matriz extracelular; e manutenção do implante peritoneal por estímulo à angiogênese (Seli et al., 2003).

Concentrações elevadas de citocinas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose poderiam refletir alterações na síntese destas substâncias por macrófagos peritoneais, linfócitos, implantes ectópicos endometriais e células mesoteliais do peritônio (Wu & Ho, 2003, Podgaec & Abrão, 2005). Esta linha de pesquisa tem sido explorada em diversas instituições, analisando-se aspectos variados do envolvimento destas substâncias na endometriose, conforme as observações de alguns estudos. Assim, Lebovic et al., em 2000, demonstraram que a IL-1 beta atuaria nas lesões de endometriose, induzindo a produção de fatores angiogênicos como o VEGF e a IL-6 em células estromais de tecido endometrial ectópico, mas não em células estromais normais. Iwabe et al (2002) demonstraram que a interleucina-6 e o TNF-alfa revelaram-se elevados no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, sendo que a presença desta interleucina associada a lesões glandulares vermelhas poderia se relacionar às situações de infertilidade.

Em 2002, Pizzo et al., registraram elevação das concentrações séricas e no fluido peritoneal de TGF-beta e IL-8 em pacientes com endometriose, cujas

dosagens diminuíram conforme a maior severidade do quadro. De modo inverso, Arici (2002) observou que as concentrações de IL-8 estavam realmente elevadas, mas aumentaram, correlacionando-se com os estádios mais graves da doença.

Imunidade Humoral

Em pacientes com endometriose, foram observadas alterações na atividade de linfócitos B e presença de auto-anticorpos circulantes em maior concentração do que em mulheres sem a doença (Gleicher et al., 1987). Weed e Arquembourg, em 1980, publicaram artigo inovador, ao demonstrarem a influência do sistema imune na endometriose. Foi observada a presença de depósitos de imunoglobulina G (IgG) e complemento no endométrio tópico, com correspondente redução nas concentrações séricas totais de complemento em mulheres com endometriose, supondo que o endométrio ectópico atuasse na indução de resposta auto-imune. Este evento foi confirmado em outro estudo que revelou elevação dos níveis das frações C3 e C4 do complemento no soro e fluido peritoneal de mulheres com endometriose quando comparadas a controles (Mathur et al., 1990).

Desta forma, levantou-se a hipótese da endometriose ser uma doença auto-imune por apresentar uma série de características comuns a este tipo de afecção (Nothnick, 2001), como: ativação policlonal de células B, anormalidades imunológicas nas funções das células T e B, dano tecidual, envolvimento de diversos órgãos, possível ocorrência familiar com base genética associada, preponderância do sexo feminino e presença de auto-anticorpos para uma variedade de fosfolípidos, histonas e polinucleotídeos.

No entanto, até os dias atuais, nenhum auto-anticorpo conseguiu ser detectado como marcador específico para endometriose. Há conjecturas quanto a possíveis antígenos, como transferrina endometrial e alfa 2-HS glicoproteína de células glandulares epiteliais, que poderiam induzir à formação de anticorpos, pois foram identificadas concentrações mais elevadas destas substâncias no fluido peritoneal de pacientes com endometriose quando comparadas a mulheres sem a doença (Mathur et al., 1999). Dmowski et al. (1995) identificaram a presença de

auto-anticorpos em metade de um grupo de 84 pacientes com endometriose submetidas à fertilização *in vitro*, incluindo-se anticorpos anti-cardiolipina, anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidiletanolamina, anti-fosfatidilglicerol, anti-ácido fosfático e anti-histona. Em nosso meio, Abrão et al. (1997) registraram elevação de anticorpos anti-cardiolipina nos estádios iniciais da endometriose.

Resposta Th1/Th2

A hipótese do balanço Th1/Th2 surgiu no final dos anos 80, a partir de observações em ratos acerca de dois subtipos de linfócitos T *helper*, chamados de Th, que diferiam nos padrões de secreção de citocinas e em outras funções (Mosmann et al., 1986). O conceito foi aplicado para o sistema imune humano (Romagnani, 1991) e, alguns anos depois, os efeitos da resposta Th1 e Th2 em doenças tornaram-se importante linha de pesquisa. (Abbas et al., 1996). Embora as células Th1 e Th2 estejam consagradas com a responsabilidade de coordenar o sistema imune, algumas discrepâncias têm sido descritas nesta hipótese. (Singh et al., 1999).

Células Th1 agem contra células cancerígenas e agentes patogênicos intracelulares, como vírus, e atuam na resposta de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos virais e bacterianos. Células Th2 atuam na proteção contra patógenos extracelulares, como parasitas multicelulares. O padrão de resposta imune Th1 é descrito como sendo o mais agressivo dos dois e, quando encontra-se exacerbado, pode gerar doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla e diabetes tipo 1. O padrão Th2 está presente nas doenças relacionadas com a atuação da IgE e a fenômenos alérgicos (Benjamini et al., 2002).

Esta diferenciação dos padrões de resposta imune ocorre, segundo Benjamini et al. (2002), a partir do contato dos linfócitos ditos Th precursores com o antígeno. Este padrão é então determinado, dependendo das seguintes variáveis:

- citocinas envolvidas neste contato;
- via de exposição ao antígeno;
- afinidade e interação antígeno / complexo de histocompatibilidade principal (CHP) / receptores dos linfócitos T;
- natureza das células apresentadoras do antígeno.

Quando há estímulo de IL-12 e IL-18 (sintetizadas por células NK e macrófagos) no contato do antígeno com o linfócito Th precursor, ocorre a diferenciação para a resposta Th1, que estimula a produção de IL-2, TNF-alfa e IFN-gama, desencadeando um processo de resposta imune predominantemente celular, que envolve a participação de células NK, macrófagos, linfócitos T citotóxicos e secreção de outras citocinas, como VEGF, e de enzimas, como as matriz metaloproteinases (MMPs). A resposta Th2 ocorre quando, no contato do linfócito Th precursor com o antígeno, há estímulo de IL-4 (produzida por mastócitos), levando à produção de mais IL-4, além de IL-5, 10 e 13, o que induz à atração de linfócitos B, desencadeando um processo envolvendo, de modo predominante, a imunidade humoral, com a produção de imunoglobulinas e ativação de eosinófilos (Figura 1). Cumpre assinalar que ambas as respostas co-existem, havendo preponderância de uma ou da outra de acordo com diferentes situações e que as citocinas da resposta Th1 inibem a secreção das citocinas da resposta Th2 e vice-versa (Benjamini et al., 2002).

Figura 1: Padrões de resposta imune Th1 e Th2 (adaptado de Benjamini et al., 2002).

Citocinas envolvidas na Resposta Th1

A interleucina-2 (IL-2) é uma citocina produzida primariamente por linfócitos T ativados, com atuação essencial na promoção da expansão clonal das células T antígeno-específicas. A IL-2 estimula a proliferação e a diferenciação de monócitos e células NK, como também a produção de outras citocinas por estas células (Goldsmith & Greene, 1994).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) é um polipeptídeo de 157 aminoácidos, com peso de 17kDa, inicialmente identificado por atuar contra certas linhagens celulares. Sabe-se hoje que tem a capacidade de ativar citocinas e outros fatores associados à resposta inflamatória. Neutrófilos, linfócitos ativados, macrófagos e células NK produzem TNF-alfa (Ruddle, 1992). Uma das principais atribuições do TNF-alfa se encontra na resistência às infecções e ao crescimento

de tumores. No entanto, em excesso pode participar de diversas situações clínicas graves como choque séptico (Tracey et al., 1987) e doenças auto-imunes (Pujol-Borrell et al., 1987).

O interferon gama (IFN-gama) é uma glicoproteína de 143 aminoácidos e 20kDa observada, pela primeira vez, como tendo atividade antiviral em culturas de leucócitos humanos infectados por vírus Sindbis (Wheelock & Sibley, 1965). Produzido por linfócitos T e células NK, o IFN-gama é um inibidor de replicação viral e tem influência na produção de anticorpos por células B e na regulação do complexo de antígenos classe I e II do CHP (Ijzermans & Marquet, 1989).

Citocinas envolvidas na Resposta Th2

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina produzida, primariamente, por linfócitos T ativados, mastócitos e basófilos. Induz a produção de IgE por linfócitos B, inibe a ação de macrófagos e a ativação de linfócitos T e regula a ação de monócitos, bloqueando a síntese de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF-alfa (Gazvani et al, 2001).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina inicialmente designada como fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF) por ser um produto das células Th2 que inibia a produção de citocinas produzidas pelas células Th1 (Fiorentino et al., 1989). Modula a função de monócitos e macrófagos e regula a resposta imune celular por suprimir a produção de substâncias pró-inflamatórias como prostaglandina E2, TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 e superóxido (Simhan et al, 2004). Em relação ao conceito da proteção ao feto, expresso na predominância do padrão de resposta Th2 durante a gestação, a IL-10 tem papel de destaque, sendo produzida na interface feto-materna que controla a resposta imune contra o feto (Vigano et al., 2002).

Resposta Th1 Th2 em diferentes situações clínicas

Vários estudos foram conduzidos para se compreender o papel das descobertas relativas às respostas Th1 e Th2, com a perspectiva de se avançar na patogênese e, conseqüentemente, no diagnóstico e tratamento de uma série

de afecções (Alviggi et al, 2006, Xia et al, 2006, Meiler et al., 2006). Indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que não desenvolvem a síndrome induzida pelo vírus por longos períodos, apresentam resposta Th2 restrita, observada pelas baixas concentrações de IL-4, sugerindo ser este fato um reflexo da modulação e/ou da regulação entre as respostas Th1/Th2, o que manteria o vírus sob controle (Tanaka et al., 1999). Foi observado que a resposta imune celular específica ao HIV é inversamente relacionada à viremia plasmática, ou seja, quanto melhor a resposta Th1, menor a carga viral (Norris & Rosenberg, 2001).

Exposições freqüentes a alérgenos podem provocar ativação de células sensibilizadas pela IgE, que liberam mediadores como histamina, leucotrienos e prostaglandinas, os quais induzem a manifestações clínicas alérgicas. A regulação exagerada de genes que controlam a expressão de IL-4 (Th2) e/ou o déficit na modulação da resposta Th2 poderia ser responsável pela resposta Th2 exagerada a alérgenos ambientais que ocorre em indivíduos atópicos (Singh et al., 1999).

Arumugan et al. (2005) aventaram a participação do padrão de resposta Th1 na patogênese do acidente vascular cerebral ao observarem que, na microvascularização da região cerebral afetada por este tipo de evento, há ativação de células endoteliais e recrutamento de leucócitos, dentre os quais os linfócitos T, adquirindo características inflamatórias. De forma semelhante, outros estudos mostraram que a porcentagem de células T positivas para o IFN-gama (Th1) encontrava-se significativamente mais elevada nos pacientes com angina instável quando comparados àqueles com angina estável. Haveria, assim, a participação desta citocina na ativação de macrófagos, formação de trombos e desestabilização de placas ateroscleróticas (Adler et al., 2005).

Na área reprodutiva, o sistema imunológico parece se amparar na relação das respostas Th1 e Th2. Mulheres com falha de implantação embrionária ou abortamento habitual tendem a apresentar desvio deste balanço, pendendo para a resposta Th1. Segundo Kwak-Kim et al. (2005), as células e citocinas que protegem o embrião, para não ser reconhecido pelo sistema imune materno como corpo estranho e ser eliminado, são produzidas pelas células Th2 (IL-4, 5, 6, 9, 10,

13), havendo concentrações mais elevadas destas citocinas durante uma gestação normal. Doenças como lupus e artrite reumatóide tendem a melhorar na gravidez, talvez porque os níveis de citocinas da resposta Th1 permanecem baixos (Schulze-Koops & Kalden, 2001).

Resposta Th1/Th2 na endometriose

Há pouca informação disponível analisando especificamente a interação entre as citocinas envolvidas e a preponderância de cada tipo de resposta imune em pacientes com endometriose. Conforme descrito anteriormente, a maioria dos autores refere-se à participação de determinada citocina na endometriose, sem observar o comportamento do conjunto relativo às respostas Th1 ou Th2. Neste particular, Hsu et al. (1997) avaliaram a expressão de citocinas por linfócitos no sangue periférico e fluido peritoneal de 36 pacientes com endometriose e de outras 14 pacientes de grupo controle sem a doença. Para essa análise, foi utilizada a reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (PCR-RT). Os autores observaram que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) da IL-4 nas células do sangue periférico e do fluido peritoneal de pacientes com endometriose achavam-se mais elevados quando comparados ao grupo controle, enquanto os níveis do mRNA do IFN-gama mostravam-se diminuídos.

Como se depreende dos dados de literatura, a endometriose é uma doença que se apresenta com diferentes facetas, a partir, provavelmente, do refluxo endometrial ou da metaplasia celular, de forma superficial ou profunda, podendo provocar dor pélvica e infertilidade ou mesmo nenhum sintoma clínico. A participação do sistema imunológico em alguma etapa deste processo baseia-se de forma consistente na literatura atual. A resposta imune humoral poderia explicar a ocorrência da endometriose de forma global, conforme as características de uma doença auto-imune. Particularmente nas formas mais agressivas, com acometimento infiltrativo, a atividade da imunidade celular parece predominar, com a ação de células, enzimas e citocinas, que propiciam adesão,

infiltração e manutenção do foco de tecido endometrial ectópico. Sendo assim, de modo semelhante às pesquisas que tratam das mais variadas situações clínicas, o presente estudo procura avaliar os padrões de resposta imune Th1 e Th2 na endometriose.

2. PROPOSIÇÃO

Propusemo-nos, neste estudo, a:

1. avaliar os padrões de resposta imune Th1 e Th2 em pacientes com endometriose por meio de dosagens séricas e no fluido peritoneal de interleucina-2, fator de necrose tumoral – alfa e interferon-gama, envolvidos na resposta Th1, e das interleucinas 4 e 10, relativas à resposta Th2.

2. relacionar em pacientes com endometriose, as dosagens séricas e no fluido peritoneal dessas citocinas com:

- a fase do ciclo menstrual;
- o quadro clínico;
- os locais de acometimento (peritônio, ovário e doença profunda);
- o estadiamento da endometriose (*American Society for Reproductive Medicine*, 1996);
- a classificação histológica.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

3.1.1. Local do estudo e pacientes

O estudo foi desenvolvido no Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), de Janeiro de 2004 a Novembro de 2005, onde foram avaliadas 98 pacientes atendidas de forma consecutiva, e que foram divididas em dois grupos: Grupo A, constituído de pacientes com endometriose e Grupo B, formado por mulheres sem a moléstia. O total de pacientes foi determinado baseando-se na possibilidade de realizar este número de procedimentos cirúrgicos, em nosso serviço, no período de tempo estipulado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMUSP (Protocolo 601/03) e todas as pacientes leram e assinaram o termo de consentimento pós-informação (Anexo 1). A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) contribuiu para a realização deste estudo com verba aprovada no processo 05/01218-3.

3.1.2. Critérios de inclusão

Determinaram-se, para o Grupo A, os seguintes critérios de inclusão:

- idade entre 18 e 40 anos;
- endometriose comprovada histologicamente;
- ausência de doenças auto-imunes, confirmada por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário;
- ausência de fator masculino como causa de infertilidade, comprovada por análise seminal (OMS, 1994);
- ciclos menstruais eumenorréicos, com intervalo entre os fluxos menstruais variando de 26 a 34 dias (Bastos, 1994);

- não utilização de terapêutica hormonal nos três meses que antecederam o procedimento cirúrgico, incluindo análogos do GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais.

Para o Grupo B, foram selecionadas pacientes com quadro clínico sugestivo de endometriose, com indicação de vídeo-laparoscopia, utilizando-se os mesmos critérios de inclusão aplicados para o Grupo A, exceto pela confirmação da ausência de endometriose durante a cirurgia.

3.2. Métodos

3.2.1. Dinâmica do estudo

Todas as pacientes foram avaliadas pela história clínica, exame físico e exames complementares (dosagem de CA125, ultra-sonografia pélvica e /ou transvaginal e ressonância nuclear magnética, quando apropriado), conforme indicação clínica, para definição da suspeita de endometriose. A laparoscopia permitiu separar os dois grupos de estudo: o com endometriose, pela confirmação histológica das amostras teciduais das áreas suspeitas, e aquele em que se descartou a presença da doença.

Foi anotado o dia do ciclo menstrual em que a paciente se encontrava no momento do procedimento cirúrgico (Anexos 2 e 3), sendo considerada fase folicular do primeiro ao décimo quarto dia do ciclo menstrual e, fase lútea, do décimo quinto ao último dia do ciclo menstrual.

Antes da anestesia geral para a vídeo-laparoscopia, foram colhidos 5ml de sangue periférico em tubo seco. A paciente foi submetida à laparoscopia, seguindo a rotina habitual do serviço. Pela punção secundária foi feita a coleta de fluido peritoneal depositado em fundo de saco anterior e/ou posterior, variando de volume entre 2 e 10ml, o qual foi também armazenado em tubo seco. O material foi encaminhado ao laboratório para ser centrifugado, aliquotado e congelado em freezer à -20°C. Depois de estocado, somente foi descongelado com a coleta

completa de todos os dados, para a realização das dosagens de TNF-alfa, IFN-gama e das interleucinas 2, 4 e 10.

3.2.2. Quadro clínico

Todas as pacientes foram questionadas quanto à presença de seis sintomas associados à endometriose (Anexos 2 e 3), quais sejam:

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

3.2.3. Estadiamento da Endometriose

As pacientes com endometriose tiveram sua doença classificada durante o procedimento cirúrgico pelos critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASMR), revisado em 1996 (Figura 2), em estádios de I a IV (Anexo 4).

Figura 2: Estadiamento da endometriose proposto pela *American Society for Reproductive Medicine* (1996).

Estádio I (mínima): 1-5

Estádio II (leve): 6-15

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio IV (severa): > 40

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

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

Porcentagem de implantes: _____

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

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

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

Endometriose adicional: _____

Patologias associadas: _____

3.2.4. Endometriose: locais de doença e classificação histológica

As pacientes com endometriose foram avaliadas quanto à presença de focos de doença no peritônio, ovário e/ou em localização infiltrativa profunda, que inclui as regiões retro-cervical, para-cervical, septo reto-vaginal, reto-sigmóide, ureteres e bexiga (Anexo 4). Os locais de comprometimento foram considerados observando-se critérios de gravidade do processo, ou seja, doença profunda mais grave que a ovariana, que por sua vez é mais grave que a doença peritoneal.

Assim, foram atribuídos como critérios para se considerar doença peritoneal, a existência de focos peritoneais exclusivos, sem a presença de doença profunda e em ovários. A doença ovariana foi determinada na ausência da doença profunda, independente de focos peritoneais. Para a doença profunda, não houve restrições pela presença de endometriose peritoneal ou ovariana.

A análise histológica dos tecidos ressecados (Anexo 4) seguiu os padrões da classificação proposta por Abrão et al., em 2003, que divide a doença em:

- a) padrão estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio típico em qualquer fase do ciclo (Figura 3a);
- b) padrão glandular bem diferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, composto por células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios típicos nas diferentes fases do ciclo menstrual (Figura 3b);
- c) padrão glandular indiferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, sem as características morfológicas vistas no epitélio endometrial típico (Figura 3c);
- d) padrão glandular misto de diferenciação: presença, na mesma localização, de epitélios com padrão bem diferenciado e indiferenciado (Figura 3d).

Figura 3a. Foco de endometriose estromal em meio à fibrose (Hematoxilina eosina, HE - 100x); **3b.** Foco de endometriose, padrões estromal e glandular bem diferenciado (HE - 400x); **3c.** Endometriose de padrões estromal e glandular indiferenciado (HE- 400x); **3d.** Endometriose de padrões estromal e glandular misto de diferenciação (HE – 100x).

3.2.5. Método laboratorial

O método laboratorial para as dosagens de TNF-alfa, IFN-gama, IL-2, IL-4 e IL-10 foi o *BD Cytometric Bead Array (CBA)*, catálogo 551809, produzido pela *Pharmingen, Becton Dickinson, Co.* (San Diego, Califórnia, EUA) e aplicado em um aparelho apropriado para citometria de fluxo (BD FACSCalibur, Franklin Lakes, New Jersey, EUA, Figura 4). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as especificações do fabricante e a concentração das amostras foi calculada com o uso de padrões conhecidos (Anexos 5 e 6).

Figura 4: Aparelho de citometria de fluxo utilizado no estudo (BD FACSCalibur)

3.3. Método estatístico

Para otimizar a análise estatística, os estádios I e II (1996) foram reunidos e denominados como estágio inicial da endometriose e, os estádios III e IV, como estágio avançado. Além disso, quanto à classificação histológica, foi considerado como diferencial a presença ou não de endometriose de padrão indiferenciado, por ser o tipo histológico de pior prognóstico (Abrão et al., 2003).

As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado e as variáveis quantitativas contínuas foram comparadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para duas amostras independentes (Grupo A e B). As pacientes com endometriose foram categorizadas, de acordo com o estágio (ASRM, 1996), o local de acometimento e a classificação histológica. Efetuou-se análise não paramétrica, com o teste estatístico Kruskal-Wallis para verificar se as dosagens séricas e do fluido peritoneal eram semelhantes ou diferentes, alternativamente. Os cálculos estatísticos foram feitos pelo software SPSS (SPSS Inc., USA), adotando-se o nível de significância de 5%.

Para se estabelecer a predominância de um tipo de resposta imune, Th1 ou Th2, optou-se pela análise de dados categorizados utilizando o percentil da variável que estava sendo avaliada. O percentil escolhido foi o de nível proporcional aos tamanhos das amostras e aplicou-se o teste de McNemar, adotando-se nível de significância de 5%. (Everitt, 1977).

4. RESULTADOS

Foram analisadas 98 mulheres, sendo 65 com endometriose (Grupo A) e 33 sem endometriose (Grupo B). A média de idade das pacientes do Grupo A foi 32,1 ($\pm 5,4$) anos, semelhante à do Grupo B, com média igual a 32,9 ($\pm 5,1$) anos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Comparação da média de idade das pacientes do Grupo A (com endometriose) em relação às pacientes do Grupo B (sem endometriose)

* $p > 0,05$

As características clínicas dos dois grupos são demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: Características das 65 pacientes do Grupo A (com endometriose) e das 33 pacientes do Grupo B (sem endometriose), analisadas de acordo com a fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.

Característica	Grupo A		Grupo B		p
	n	%	n	%	
Fase do ciclo menstrual					
Folicular	56	86,2	25	75,8	0,199
Lútea	9	13,8	8	24,2	
Dismenorréia					
Presente	42	64,6	9	27,3	<0,001*
Ausente	23	35,4	24	72,7	
Dispareunia					
Presente	32	49,2	12	36,4	0,226
Ausente	33	50,8	21	63,6	
Dor acíclica					
Presente	39	60,0	13	39,4	0,053
Ausente	26	40,0	20	60,6	
Infertilidade					
Presente	22	33,8	8	24,2	0,330
Ausente	43	66,2	25	75,8	
Alteração Intestinal Cíclica					
Presente	32	49,2	2	6,1	<0,001*
Ausente	33	50,8	31	93,9	
Alteração Urinária Cíclica					
Presente	2	3,1	0	0,0	0,309
Ausente	63	96,9	33	100,0	

*p<0,05

Entre as pacientes com endometriose que referiam dispareunia de profundidade (n=32), 65,5% apresentavam a forma infiltrativa profunda da doença e, dentre aquelas que não apresentavam este sintoma (n=33), 30,3% eram portadoras de endometriose profunda (Anexos 2 e 4).

Ao se analisar o quadro clínico das pacientes com endometriose e a gravidade dos casos, observamos haver relação direta entre a severidade de ambos, ou seja, quanto mais intenso o sintoma, mais grave a doença (Gráfico 2). Esta gravidade foi calculada pela ocorrência da endometriose em seus diferentes locais de acometimento e do estadiamento da ASRM (1996), ou seja, considerou-

se mais grave a manifestação da endometriose profunda e do estágio avançado e, menos grave, a doença peritoneal e o estágio inicial.

Gráfico 2: Análise da gravidade do quadro clínico referido pelas pacientes com endometriose em relação à gravidade da doença confirmada em procedimento cirúrgico.

A Tabela 2 compara as concentrações das citocinas encontradas nos dois grupos. Observou-se diferença significativa nas concentrações do IFN-gama (presente na resposta Th1) e da IL-10 (presente na resposta Th2) medidos no fluido peritoneal das pacientes com endometriose em relação àquelas sem endometriose, sendo que as pacientes com endometriose apresentaram valores mais elevados desses dois marcadores. Ao se verificar em quais casos estas alterações ocorreram, foi possível observar que 9 de 13 pacientes que apresentaram IFN-gama elevado, eram portadoras de endometriose profunda (Anexos 4 e 5). No caso da IL-10, esta particularidade não foi observada. Além disso, deve ser citado que em oito pacientes do Grupo A e quatro do Grupo B, não havia fluido peritoneal suficiente a ser coletado.

Tabela 2: Mediana das concentrações séricas e do fluido peritoneal das citocinas (pg/ml) das pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B).

Citocinas	Grupo A	Grupo B	p
TNF-alfa (sangue)	2,3	3,7	0,188
IFN-gama (sangue)	1,6	2,1	0,571
IL-2 (sangue)	7,4	8,3	0,447
IL-4 (sangue)	1,9	2,0	0,731
IL-10 (sangue)	3,2	3,1	0,904
TNF-alfa (fluido peritoneal)	3,1	1,4	0,364
IFN-gama (fluido peritoneal)	0,5*	0,1	0,039*
IL-2 (fluido peritoneal)	0,2	0,2	0,072
IL-4 (fluido peritoneal)	1,7	0,9	0,557
IL-10 (fluido peritoneal)	28,6*	15,7	0,035*

*p<0,05

As Tabelas 3 e 4 indicam a relação entre os padrões de respostas Th1 e Th2 a partir das concentrações das citocinas séricas e do fluido peritoneal, utilizando-se a categorização dos resultados e o teste de MacNemar. Nestas análises são comparados quais resultados estão mais elevados e são descritos os níveis de significância (valores de p) de cada relação das citocinas, quais sejam, IL4/TNF-alfa, IL-4/IFN-gama, IL-4/IL-2, IL-10/TNF-alfa, IL-10/IFN-gama e IL-10/IL-2. Desta forma, notamos diferenças significantes nas relações IL-4/IFN-gama, IL-4/IL-2, IL-10/IFN-gama e IL-10/IL-2 das dosagens do fluido peritoneal do grupo de pacientes com endometriose, com predomínio de IL-4 e IL-10 (resposta Th2) sobre IFN-gama e IL-2 (resposta Th1).

Não houve diferença estatisticamente significativa da relação Th1/Th2 envolvendo as citocinas séricas. De modo semelhante, não se observou diferença na análise desta relação comparando-se os diferentes parâmetros avaliados, quais sejam, estadiamento da ASRM, local de acometimento e diferenciação histológica da endometriose, independente do local de coleta das amostras.

Tabela 3: Descrição dos níveis de significância da relação entre as concentrações séricas das citocinas envolvidas na resposta Th1 (TNF-alfa, IFN-gama e IL-2) e na resposta Th2 (IL-4 e IL-10) nas pacientes dos grupos com e sem endometriose (Grupos A e B, respectivamente).

	Grupo A n=65 IL-4	Grupo A n=65 IL-10	Grupo B n=33 IL-4	Grupo B n=33 IL-10
TNF-alfa	0,41	0,58	0,82	0,89
IFN-gama	0,50	0,68	0,34	0,36
IL-2	0,39	0,59	0,85	0,85

Tabela 4: Descrição dos níveis de significância da relação entre as concentrações do fluido peritoneal das citocinas envolvidas na resposta Th1 (TNF-alfa, IFN-gama e IL-2) e na resposta Th2 (IL-4 e IL-10) nas pacientes dos grupos com e sem endometriose (Grupos A e B, respectivamente).

	Grupo A n=57 IL-4	Grupo A n=57 IL-10	Grupo B n=29 IL-4	Grupo B n=29 IL-10
TNF-alfa	0,89	0,32	0,68	0,50
IFN-gama	<0,001*	<0,001*	0,09	0,09
IL-2	0,006*	<0,001*	0,19	0,10

*p<0,05

A Tabela 5 descreve e compara os valores das medianas das concentrações séricas das citocinas entre as pacientes dos grupos com endometriose (A) e sem a doença (B) de acordo com a fase do ciclo menstrual e com o sintoma referido pelas pacientes. Foi encontrada elevação do TNF-alfa nas pacientes do Grupo A com dispareunia de profundidade quando comparadas ao Grupo B.

Tabela 5: Comparação das medianas das concentrações séricas das citocinas (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.

Característica	TNF-alfa	IFN-gama	IL-2	IL-4	IL-10
Fase Folicular do ciclo menstrual					
Grupo A (n=56)	2,3	1,7	7,8	1,9	3,3
Grupo B (n=25)	3,5	1,8	9,2	2,5	3,0
Fase Lútea do ciclo menstrual					
Grupo A (n=9)	3,7	1,4	5,6	1,7	2,4
Grupo B (n=8)	4,1	2,3	7,5	2,0	3,7
Dismenorréia - Presente					
Grupo A (n=42)	2,6	1,7	7,2	2,0	3,3
Grupo B (n=9)	4,4	2,4	9,3	3,0	4,9
Dispareunia - Presente					
Grupo A (n=32)	4,5*	1,6	7,6	1,8	3,0
Grupo B (n=12)	2,3	2,3	8,0	2,9	3,6
Dor acíclica – Presente					
Grupo A (n=39)	2,0	0,0	6,1	1,7	3,2
Grupo B (n=13)	3,5	2,1	9,7	2,6	3,0
Infertilidade – Presente					
Grupo A (n=22)	2,2	1,7	5,9	1,7	2,5
Grupo B (n=8)	4,2	1,3	2,7	2,0	3,1
Alteração Intestinal Cíclica – Presente					
Grupo A (n=32)	2,3	1,4	6,1	1,5	3,6
Grupo B (n=2)	6,2	2,8	8,1	2,2	2,6
Alteração Urinária Cíclica – Presente					
Grupo A (n=2)	2,3	0,8	4,6	1,4	2,8
Grupo B (n=0)	-	-	-	-	-

* p<0,05

A comparação das medianas das concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal de acordo com a fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico entre as mulheres avaliadas encontra-se na Tabela 6. As pacientes com endometriose que apresentaram infertilidade mostraram concentrações de IL-2 mais elevadas que os controles. Entre o total de pacientes com infertilidade e endometriose (n=22), nota-se que 63,6% (n=14) apresentavam endometriose profunda (Anexos 2 e 4).

Tabela 6: Comparação das medianas das concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com fase do ciclo menstrual e com o quadro clínico.

Característica	TNF- alfa	IFN- gama	IL-2	IL-4	IL-10
Fase Folicular do ciclo menstrual					
Grupo A (n=56)	2,3	1,7	7,8	1,9	3,3
Grupo B (n=25)	0,7	0,0	0,0	0,8	19,0
Fase Lútea do ciclo menstrual					
Grupo A (n=9)	3,7	1,4	5,6	1,7	2,4
Grupo B (n=8)	2,1	0,0	0,0	0,0	30,0
Dismenorréia - Presente					
Grupo A (n=42)	2,6	1,7	7,2	2,0	3,3
Grupo B (n=9)	4,4	0,0	1,0	8,1	24,4
Dispareunia - Presente					
Grupo A (n=32)	2,3	1,6	7,6	1,8	3,0
Grupo B (n=12)	4,0	0,0	0,0	1,8	10,8
Dor acíclica – Presente					
Grupo A (n=39)	2,0	0,0	6,1	1,7	3,2
Grupo B (n=13)	1,6	0,0	0,0	0,9	30,7
Infertilidade – Presente					
Grupo A (n=22)	2,2	1,7	5,9*	1,7	2,5
Grupo B (n=8)	0,0	0,0	0,2	1,5	30,1
Alteração Intestinal Cíclica – Presente					
Grupo A (n=32)	2,3	1,4	6,1	1,5	3,6
Grupo B (n=2)	3,1	0,0	0,0	0,0	30,7
Alteração Urinária Cíclica – Presente					
Grupo A (n=2)	2,3	0,8	4,6	1,4	2,8
Grupo B (n=0)	-	-	-	-	-

* p<0,05

A comparação das medianas das concentrações séricas das citocinas entre características das pacientes dos Grupos A e B, mostra não haver diferença quanto ao estadiamento (ASRM, 1996), local de acometimento e diferenciação histológica da endometriose (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação das medianas das concentrações séricas das citocinas (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com estadiamento (ASRM, 1996), local de acometimento e classificação histológica da endometriose.

Característica	TNF-alfa	IFN-gama	IL-2	IL-4	IL-10
Estadiamento					
Grupo A – Inicial (n=28)	3,8	2,0	8,1	2,1	2,8
Grupo A – Avançada (n=37)	2,3	1,5	6,1	1,7	3,7
Grupo B (n=33)	3,7	2,1	6,1	2,0	3,1
Local de acometimento					
Grupo A – Com doença peritoneal (n=12) Δ	2,3	1,8	3,4	2,1	3,3
Grupo A – Sem doença peritoneal (n=36)	2,4	1,5	8,8	1,7	3,2
Grupo B (n=33)	3,7	2,1	6,1	2,0	3,1
Grupo A – Com doença ovariana (n=19) $\Delta\Delta$	2,7	1,6	8,9	1,9	3,4
Grupo A – Sem doença ovariana (n=24)	2,3	2,0	0,0	1,9	2,5
Grupo B (n=33)	3,7	2,1	6,1	2,0	3,1
Grupo A – Com doença profunda (n=34) $\Delta\Delta\Delta$	2,0	1,6	8,3	1,7	3,4
Grupo A – Sem doença profunda (n=31)	3,8	1,9	7,8	2,1	3,0
Grupo B (n=33)	3,7	2,1	6,1	2,0	3,1
Tipo histológico					
Grupo A – Com doença indiferenciada (n=39)	2,4	1,5	6,1	1,7	3,3
Grupo A – Sem doença indiferenciada (n=26)	2,2	2,0	7,8	2,2	3,2
Grupo B (n=33)	3,7	2,1	6,1	2,0	3,1

Δ - focos peritoneais exclusivos, sem a presença de doença profunda e em ovários

$\Delta\Delta$ - ausência da doença profunda, independente de focos peritoneais

$\Delta\Delta\Delta$ - independente da presença de endometriose peritoneal ou ovariana

A Tabela 8 avalia as concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal nos grupos estudados, em relação ao estadiamento (ASRM, 1996), local de comprometimento e classificação histológica da doença. Notamos ser a concentração de IL-10 mais elevada nos casos de endometriose de ovário, na ausência de doença profunda, independente da presença de focos peritoneais.

Tabela 8: Comparação das medianas das concentrações das citocinas dosadas no fluido peritoneal (pg/ml) entre os grupos de pacientes com (Grupo A) e sem endometriose (Grupo B) de acordo com estadiamento (ASRM, 1996), local de acometimento e diferenciação histológica da endometriose.

Característica	TNF-alfa	IFN-gama	IL-2	IL-4	IL-10
Estadiamento					
Grupo A – Inicial (n=28)	3,3	0,0	0,0	1,2	18,7
Grupo A – Avançada (n=37)	2,9	0,0	0,0	2,1	46,1
Grupo B (n=33)	1,4	0,0	0,0	0,0	25,7
Local de acometimento					
Grupo A – Com doença peritoneal (n=12) Δ	2,8	0,0	0,8	2,0	27,1
Grupo A – Sem doença peritoneal (n=36)	3,4	0,0	0,0	1,6	30,9
Grupo B (n=33)	1,4	0,0	0,0	0,0	25,7
Grupo A – Com doença ovariana (n=19) $\Delta\Delta$	2,4	0,0	0,0	1,7	50,0*
Grupo A – Sem doença ovariana (n=24)	3,8	0,0	0,0	2,0	18,7
Grupo B (n=33)	1,4	0,0	0,0	0,0	25,7
Grupo A – Com doença profunda (n=34) $\Delta\Delta\Delta$	3,2	0,0	0,0	2,0	30,9
Grupo A - Sem doença profunda (n=31)	2,4	0,0	0,0	0,6	25,5
Grupo B (n=33)	1,4	0,0	0,0	0,0	25,7
Tipo histológico					
Grupo A – Com doença indiferenciada (n=39)	2,3	0,0	0,0	1,8	35,7
Grupo A – Sem doença indiferenciada (n=26)	3,4	0,0	0,0	1,6	28,0
Grupo B (n=33)	1,4	0,0	0,0	0,0	25,7

* $p < 0,05$

Δ - focos peritoneais exclusivos, sem a presença de doença profunda e em ovários

$\Delta\Delta$ - ausência da doença profunda, independente de focos peritoneais

$\Delta\Delta\Delta$ - independente da presença de endometriose peritoneal ou ovariana

5. DISCUSSÃO

As pesquisas dentro da área médica se desenvolvem com grande velocidade em diferentes setores do conhecimento, atingindo com facilidade uma vasta gama de pessoas que atuam na seara científica, graças aos meios de comunicação disponíveis atualmente. No tocante à endometriose, observa-se, com freqüência, discussões de grupos de especialistas acerca de quase todos os tópicos da doença. Como e porque a endometriose se desenvolve? Qual o perfil epidemiológico da mulher com endometriose? Qual o melhor tratamento?

É possível exemplificar esta visão ao se analisar recente publicação, onde médicos de diferentes serviços europeus se reuniram para desenvolver recomendações para o diagnóstico e tratamento da endometriose. Algumas conclusões surgiram de meta-análise de estudos randomizados e controlados, como a sugestão do uso igualmente eficaz de qualquer droga hormonal para o tratamento da dor em mulheres com diagnóstico confirmado de endometriose. No entanto, a falta de pesquisas com desenho adequado, trouxe apenas dados informativos como a afirmação que a ablação cirúrgica dos focos de doença tem pouca eficácia no tratamento da dor em pacientes com endometriose mínima e que não há evidência suficiente para determinar se a excisão de endometriose moderada e severa melhora as taxas de gestação (Kennedy et al., 2005).

Tais assertivas podem ser confrontadas com artigos publicados relativos a cada assunto mencionado. De forma semelhante, as questões abordadas no presente estudo foram propostas no sentido de trazer novas informações que pudessem garantir substrato no campo da imunologia, tópico atual e promissor, que se relaciona com a etiopatogenia, o diagnóstico e o tratamento da endometriose.

Os grupos e a dinâmica do estudo

Nos 23 meses de coleta de dados, foram incluídas 98 mulheres, todas com indicação clínica de vídeo-laparoscopia. Diagnosticamos endometriose em 65 destas pacientes (Grupo A) e confirmou-se sua ausência em 33 pacientes (Grupo

B). Esta é, em nossa óptica, a solução que ampara a realização de pesquisa que tem a proposta de comparar um determinado fator entre mulheres com e sem endometriose, pois, a visualização da pelve descarta o viés da dúvida da presença ou não da doença. A escolha de grupo controle de pacientes com sintomas, mas sem a moléstia permite comparar o quadro clínico referido pelas mulheres de ambos os grupos. Além disso, a semelhança dos períodos relativos à fase do ciclo menstrual em que as pacientes se encontravam no momento da coleta do sangue e do fluido peritoneal e da faixa etária de ambos os grupos, assegura outros parâmetros que poderiam invalidar a amostra estudada.

Na análise do quadro clínico, nota-se haver diferença significativa no grupo de mulheres com endometriose que apresentaram maior percentual de dismenorréia severa ou incapacitante e alteração intestinal cíclica quando comparadas às sem a doença. Este dado acha-se de acordo com perfis clínicos da doença, como já foi descrito em 1995, e revisado em 2000, em nosso serviço (Abrão et al., 1995, Abrão & Podgaec, 2000), onde ao redor de 90% das pacientes com endometriose referiram dismenorréia durante o interrogatório clínico e 40%, alterações intestinais cíclicas, cifras semelhantes às análises epidemiológicas feitas em outros países (Hemmings et al., 2004; Perry, 2005).

A outra questão relativa ao quadro clínico originou-se da comparação entre a intensidade dos sintomas referidos pelas pacientes e a gravidade da doença diagnosticada nos procedimentos cirúrgicos. Desvelou-se relação direta neste quesito, ou seja, quanto maior a intensidade dos sintomas, mais grave a moléstia. Como exemplo, 65,5% das pacientes com endometriose que possuíam dispareunia de profundidade apresentavam a forma infiltrativa profunda da doença e dentre aquelas que não referiram este sintoma, somente 30.3% eram portadoras de endometriose profunda. A propósito, Fauconier e Chapron (2003) obtiveram dados similares, revelando que, em casos de endometriose profunda, os sintomas têm certa especificidade com o local de acometimento da lesão.

Método laboratorial

O método laboratorial utilizado neste estudo foi a citometria de fluxo. O termo citometria se refere à medida (metria) das células (cito). Esta pode ser das propriedades físicas (tamanho, volume) ou bioquímicas das células (conteúdo protéico, lipídico) e, tradicionalmente, tem sido realizada por microscopia ótica ou fluorescente, processo lento e operador-dependente. O termo citometria de fluxo se refere ao mesmo procedimento de medida das propriedades celulares, porém realizada conforme a passagem do fluxo celular por um grupo de detectores. O processo ocorre a partir da introdução de amostra celular no centro de uma corrente de fluido para manter um foco hidrodinâmico. No ponto de medida, a corrente celular é “cortada” por um raio de luz a *laser* que informa a um detector, através da medida de luz obtida, o tamanho da partícula em questão. Esta medida é feita em milhares de células, independente da heterogeneidade da amostra (Chen et al., 1999).

Com esta técnica, as medidas das concentrações das citocinas estudadas (IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4 e IL-10) foram processadas a partir de uma única amostra de cinco microlitros de sangue e outra de cinco microlitros de fluido peritoneal em uma única passagem, procedimento de extrema vantagem em relação aos kits tradicionais de dosagem de citocinas que utilizam o método ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado à enzima), onde cada citocina deve ser dosada separadamente (Cook et al., 2001). Não há na literatura descrição de estudo semelhante a este, analisando, com este método, este grupo de citocinas em pacientes com endometriose.

Estudo que apresenta certa analogia com o nosso foi conduzido pelo CDC (*Center for Diseases Control*) norte-americano em área endêmica para leishmaniose visceral em Bangladesh, analisando com método de múltiplo ensaio, diversas citocinas relacionadas às respostas Th1 e Th2 em 110 indivíduos da região. Os autores observaram que os pacientes que apresentaram elevação das citocinas envolvidas na resposta Th1, tornando-a competente, tenderam a desenvolver quadros limitados da doença. No entanto, a resposta Th2

predominante se associou a quadros clínicos mais graves, incluindo os casos de calazar (Kurkjian et al., 2006).

Comparação entre as dosagens das citocinas nos grupos de estudo

A concepção do estudo parte do princípio que alterações do sistema imune estão envolvidas com a endometriose. Desta forma, ao serem realizadas as dosagens séricas e no fluido peritoneal da IL-2, IL-4, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama, estes resultados foram comparados entre as pacientes com e sem endometriose. As primeiras diferenças estatisticamente significativas foram observadas nas pacientes com endometriose que possuíam concentrações mais elevadas de IFN-gama e IL-10 no fluido peritoneal em relação àquelas sem endometriose.

A literatura é farta e conflitante ao analisar a ação de cada citocina na endometriose. Um dos estudos iniciais que avaliou este tema trouxe resultados semelhantes aos nossos, sobretudo os referentes a IL-10. Punnonen et al. (1996) analisaram as concentrações de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 no fluido peritoneal de 15 pacientes com endometriose e de 12 mulheres submetidas à laqueadura tubária para observar o tipo de resposta imune encontrada na endometriose. Concluíram que as concentrações de IL-6 e IL-10 estavam elevadas nas pacientes com a doença. Da mesma forma, Tabibzadeh et al. (2003) observaram elevação de IL-10 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose.

De modo diverso, ao se avaliar a atuação da IL-6 e IL-10, verificou-se que a secreção destas citocinas por células de sangue periférico em pacientes submetidas à fertilização *in vitro* estava mais elevada nas férteis do grupo controle do que nas com endometriose. Além disso, a secreção de IL-10 também achava-se mais alta nas pacientes férteis do que nas com infertilidade sem causa aparente. Esses resultados trouxeram evidências de que a resposta Th2 facilitaria a implantação trofoblástica no início da gestação (Ginsburg et al., 2005).

Ho et al., em 1997, realizaram pesquisa para verificar alterações nas subpopulações linfocitárias em pacientes com endometriose. Os autores coletaram fluido peritoneal de pacientes submetidas à laparoscopia, efetuaram

fenotipagem das células e analisaram as concentrações de IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-gama. As taxas de IL-10 e IL12 estavam significativamente mais elevadas nas pacientes com estádios iniciais de endometriose, enquanto os níveis de IL-4 não se alteraram. A IL-4 também não apresentou diferenças em suas concentrações no fluido peritoneal de 24 pacientes com endometriose e de 28 mulheres sem a doença, em relação à fase do ciclo menstrual e ao estadiamento da endometriose (Gazvani et al., 2001).

No que concerne ao IFN-gama, resultado diferente do obtido em nosso estudo foi observado por Khorram et al. (1993) que realizaram cirurgia pélvica em 36 mulheres, sendo 12 controles e 24 com endometriose. Observaram que as concentrações de IFN-gama no fluido peritoneal não se alteraram nas pacientes com endometriose.

Dois estudos descreveram a importância desta citocina na patogênese da endometriose. Nishida et al. (2005) publicaram pesquisa relevante, por sua metodologia e conclusões obtidas, cujo objetivo foi avaliar os efeitos do IFN-gama na inibição do crescimento celular e da apoptose em cultura de células endometriais. Os autores notaram haver inibição da proliferação celular e da síntese de DNA das células estromais do endométrio típico de pacientes com endometriose e de células endometriais estromais normais, induzindo a apoptose nestas células. Com estes resultados, propuseram que as células endometriais ectópicas apresentaram maior resistência à apoptose induzida por IFN-gama, o que aumentaria a chance destas células sobreviverem e se implantarem fora do útero.

O segundo estudo foi realizado por Wu et al. (2004), os quais analisaram o endométrio típico e ectópico de oito mulheres com endometriose. Concluíram que o estímulo peritoneal de IFN-gama está significativamente associado com a expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1) na endometriose. Tal fato permitiria que células do refluxo endometrial menstrual se espalhassem e invadissem outros sítios.

Na questão do diagnóstico laboratorial aplicando o uso de citocinas na endometriose, Bedaiwy et al. (2002) realizaram dosagens séricas e do fluido

peritoneal de IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 e TNF-alfa em 130 mulheres submetidas a vídeo-laparoscopia por infertilidade, dor pélvica, laqueadura tubária ou reversão de laqueadura tubária. Deste grupo, 56 pacientes apresentavam endometriose. Os autores concluíram que níveis acima de 15 pg/ml de TNF-alfa no fluido peritoneal proporcionaram 100% de sensibilidade e 89% de especificidade e, quando a concentração sérica da IL-6 situava-se acima de 2 pg/ml, a sensibilidade foi de 90% e a especificidade de 67% para as pacientes com endometriose em comparação ao grupo controle. Em nosso estudo, a dosagem de TNF-alfa não mostrou tal diferença estatística.

Diversos autores conferem ao TNF-alfa ação significativa na endometriose. Bergqvist et al. (2001) analisaram a presença de IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa no endométrio tópico de pacientes com e sem endometriose e no foco de endometriose. Concluíram estar a produção dessas três citocinas elevada no endométrio tópico das pacientes com a doença, assim como no próprio tecido endometriótico quando comparados às mulheres sem endometriose. De igual modo, Braun et al. (2002) realizaram cultura de células provenientes de endométrio tópico e ectópico com fluido peritoneal e TNF-alfa. Observaram que as células endometriais de mulheres com endometriose utilizam fatores do fluido peritoneal, como o TNF-alfa, para facilitar a proliferação do tecido ectópico, enquanto as mesmas células de mulheres sem a doença não realizam esta atividade.

Avaliação da relação entre citocinas e da resposta Th1 Th2

Como interpretação inicial, a análise dos dados obtidos em nosso estudo não permite a extrapolação dos resultados quanto à atividade Th1 e Th2, pois, houve elevação de uma citocina de cada tipo de resposta: IFN-gama da resposta Th1 e IL-10 da resposta Th2. No entanto, a interpretação destes dados depende da relação entre as citocinas, ou seja, se observamos a elevação da concentração de uma citocina em detrimento da redução de outra citocina, o que refletiria indiretamente o balanço das respostas Th1 e Th2.

Em nosso estudo, os resultados revelaram que as concentrações de IL-4 (citocina da resposta Th2) mostravam-se mais elevadas no fluido peritoneal das pacientes com endometriose relativamente ao IFN-gama e a IL-2 (citocinas da resposta Th1), assim como a IL-10 (Th2) que apresentava o mesmo comportamento. Nas mulheres sem endometriose, este comportamento não foi observado. Desta forma, é possível inferir o predomínio do padrão de resposta Th2 sobre a Th1 nas pacientes com endometriose.

Conforme mencionado e citado com uma série de referências, diversos estudos analisaram pontualmente uma citocina isolada ou um painel destas substâncias, obtendo resultados que demonstravam elevação ou diminuição de determinada citocina. Neste estudo em particular, também foram obtidos resultados deste tipo, com a elevação do IFN-gama e da IL-10 no fluido peritoneal das pacientes com endometriose. Mas a informação mais significativa remete à relação entre as citocinas trazendo a balança da resposta imune para o braço Th2. Resultado obtido por Hsu et al. (1997) pode ser citado por apresentar conclusão comparável, apesar de a metodologia ser diferente, ao observarem elevação da expressão dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) da IL-4 nas células Th2 do sangue periférico e do fluido peritoneal de pacientes com endometriose.

Antsiferova et al. (2005) aplicaram os dois métodos, citometria de fluxo e análise da expressão de IL-2, IL-4 e IL-10 através de seu RNA mensageiro (mRNA) por reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (PCR-RT), para analisar a síntese de citocinas e a ativação linfocitária no sangue periférico e no tecido endometrial (tópico e ectópico) de 15 pacientes com endometriose e de 20 mulheres sem a doença. Os resultados deste estudo revelaram que a expressão do mRNA e a síntese intracelular de IL-4 e IL-10 estavam elevadas nos linfócitos periféricos e a concentração de linfócitos B achava-se alta nos focos de endometriose. Os autores apresentam conclusão semelhante à do presente estudo, afirmando que “o desenvolvimento da endometriose se acompanha da ativação de resposta imune do tipo Th2 em níveis local e sistêmico”.

A observação da maior presença de auto-anticorpos em mulheres com endometriose também é coerente com este resultado. Em estudo conjunto de

nosso serviço com o Departamento de Reumatologia do HCFMUSP, foram analisadas quarenta e cinco pacientes com endometriose, sem lúpus eritematoso sistêmico (LES) e quinze, com LES, porém sem endometriose. Anticorpos anti-nucleares foram detectados em 18% das pacientes com endometriose e em 93% das mulheres com LES (Pasoto et al., 2005).

Avaliação das citocinas e da resposta Th1 Th2: comparação com os diferentes parâmetros da endometriose

Neste estudo, elaborou-se uma proposição baseada em dados de literatura que sugerem que as citocinas relacionadas às respostas Th1 e Th2 estão envolvidas com a gênese da endometriose. Na elaboração desta hipótese, para depurar as informações que seriam obtidas, as seguintes perguntas foram lançadas:

- em pacientes com endometriose, alguma citocina se altera e, conseqüentemente, algum tipo de resposta linfocitária predomina, de acordo com a fase do ciclo menstrual em que esta paciente se encontra quando comparada com pacientes sem a doença?
- há alguma modificação de acordo com o quadro clínico que a paciente apresenta ou com o estágio (ASRM, 1996), local de acometimento ou diferenciação histológica da endometriose?

Os resultados demonstraram não haver diferença estatística relativa à fase do ciclo menstrual em que as citocinas foram dosadas, assim como quanto à diferenciação histológica da endometriose. No entanto, observaram-se diferenças significantes nas seguintes situações:

- quadro clínico: elevação de TNF-alfa sérico nas pacientes com endometriose com dispareunia de profundidade e elevação da IL-2 no fluido peritoneal nas pacientes com endometriose que apresentavam infertilidade quando comparadas às sem endometriose;
- local de acometimento: elevação da IL-10 nas pacientes com endometriose ovariana e sem endometriose profunda, independente de lesões

peritoneais, em relação às sem endometriose no ovário e àquelas pacientes sem endometriose.

Fase do ciclo menstrual

Há extensa controvérsia em estabelecer se há variação na concentração de citocinas de acordo com a fase do ciclo menstrual, ou seja, se a produção e secreção destas substâncias sofrem interferência de algum tipo de hormônio. No presente estudo, não se detectou diferença nas dosagens das citocinas quando se verificou a presença de endometriose, pois, comparando-se as concentrações de cada citocina na fase folicular e na fase lútea, na presença e na ausência da doença, não houve variação estatística.

Alguns estudos se contrapõem a este dado, justificando a influência da progesterona na atuação das citocinas. Tabibzadeh et al. (1989) relataram que os níveis de IL-6 expressos por células endometriais são baixos na fase proliferativa do ciclo enquanto as concentrações de estrogênio permanecem elevadas; os níveis de IL-6 são maiores durante a fase secretora do ciclo quando a atividade estrogênica é baixa. Estas flutuações refletem haver relação inversa entre esta citocina e a ação estrogênica. Harada et al. (1997) observaram variações cíclicas nas concentrações de IL-6 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, as quais são significativamente mais elevadas na fase lútea do que na folicular. Arici et al. (2003) registraram ser os níveis de IL-18 no fluido peritoneal significativamente mais elevados na fase lútea do que na folicular de pacientes com endometriose, não apresentando diferenças entre as mulheres com dor pélvica ou infertilidade.

Um fato que poderia ser considerado de forma análoga na endometriose, consiste na observação de von Wolff et al. (2000), os quais mostraram que algumas citocinas como a IL-1 beta e a IL-6 apresentam elevação progressiva em suas expressões no endométrio durante a fase lútea em ciclos naturais. Considerando-se a ação da progesterona, este hormônio contribui para a supressão natural da imunidade celular que ocorre na gravidez, permitindo o desenvolvimento do feto, o que caracteriza um efeito de predominância Th2.

Estudo com ratos que se tornaram artríticos por inoculação experimental do agente da doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), demonstrou o efeito regulador da progesterona na resposta Th2. Quando as ratas se tornavam prenhas a artrite melhorava e os níveis de IL-4 (Th2) se elevavam. De modo semelhante, em ratas sob efeito apenas da progesterona, os resultados obtidos eram os mesmos (Moro et al., 2001). Um dos principais tratamentos clínicos da endometriose consiste no uso de progesterona, em diferentes vias de administração, com bons resultados (Crosignani et al., 2005, Petta et al., 2005), talvez por este mesmo motivo.

Por outro lado, em estudo onde foi coletado fluido peritoneal de 30 mulheres com endometriose e de 20 mulheres sem a doença, para análise de IL-6 e dos esteróides ovarianos, verificou-se elevação significativa de IL-6 e de estradiol nas pacientes com estádios iniciais de endometriose (Khan et al., 2002). Citando outros estudos relativos a este tema, em pacientes com endometriose, não foram observadas diferenças quanto à fase do ciclo menstrual em que foram realizadas as dosagens de IL-4, IL-6, IL-12 e IL-18 (Mahnke et al., 2000, Gazvani et al., 2001, Zhang et al., 2004).

Quadro clínico da endometriose

Os dois pilares clínicos da endometriose são a dor pélvica e a infertilidade. Cerca de 50% das pacientes com dor pélvica, incluindo-se dismenorréia, dispareunia de profundidade e dor pélvica acíclica, submetidas a vídeo-laparoscopia, têm o diagnóstico de endometriose confirmado (Lamvu et al., 2005). O binômio dor pélvica e endometriose tem sido alvo de pesquisas de alta complexidade, envolvendo a neurociência, que tenta atualmente atrelar o processo de sensibilização central à causa da dor em pacientes com essa doença. Nesta teoria, a lesão ectópica, mesmo de pequena proporção, provocaria um estímulo no circuito neural que permaneceria ativado mesmo após a ressecção cirúrgica do foco de endometriose, o que explicaria a permanência e a recidiva de dor (Berkley et al., 2005). Outro dado relevante pode ser analisado por estudo realizado em grupo de 100 pacientes com endometriose, sendo 50 com dor pélvica e 50 sem dor, que revelou que 86% das mulheres com dor pélvica crônica

e 38% das sem esta queixa preencheram os critérios para o diagnóstico de depressão (Lorençatto et al., 2006).

Nos casos de maior extensão da doença, com aderências e significativa distorção anatômica, a explicação para a sintomatologia referida pelas pacientes tem sido creditada ao processo inflamatório que se instala na pelve, com aumento de produção de prostaglandinas e enzimas lisossomais, induzindo à formação de fibrose (Thomson & Redwine, 2005). As alterações observadas no presente estudo são concordantes com estes dados, pois, em pacientes com dispareunia de profundidade houve elevação das concentrações de TNF-alfa, citocina participante da resposta Th1, a qual, conforme discutido anteriormente, corresponde ao processo de ação das células NK, linfócitos T citotóxicos, secreção de VEGF e enzimas matriz metaloproteinases. Em particular, a dispareunia de profundidade pode indicar a presença de lesões de endometriose profunda, o que, da mesma forma, seria coerente com os resultados obtido pela elevação da IL-2 nos casos deste tipo de doença, como será discutido a seguir.

No quesito infertilidade, as pacientes do Grupo A que referiram este sintoma (22 casos) apresentaram concentrações de IL-2 no fluido peritoneal mais elevadas em comparação com as do Grupo B (8 casos). Ao se analisar em quais pacientes esta elevação ocorreu, nota-se que em 63,6% das mulheres (14 casos), a endometriose profunda foi detectada. Agrupando-se estas informações, os casos de endometriose profunda são os mais complexos e que, em geral, geram mais evidências que comprometem a fertilidade devido aos processos fibróticos que podem atingir as tubas uterinas, órgãos essenciais no processo de fertilização espontânea (Chapron et al., 2004, Darai et al., 2005). Esses dados são coerentes com a predominância de uma citocina que faz parte do padrão de resposta imune Th1. Vale ressaltar que, além destas razões descritas na etiologia da infertilidade associada à endometriose, outros mecanismos envolvidos nesta questão têm sido extensamente discutidos em diferentes linhas de pesquisa, incluindo a própria imunologia, fatores genéticos e hormonais (Rossi et al., 2005; Skrzypczak et al., 2005, Wunder et al., 2005).

Estadiamento, locais de acometimento e classificação histológica da endometriose

O estadiamento da endometriose, proposto em 1985 e revisado em 1996 pela *American Society for Reproductive Medicine*, procura classificar a doença de acordo com a extensão de acometimento da pelve, considerando a presença de lesões e de processos aderenciais peritoneais e ovarianos. Apesar de aceito até os dias atuais, pois permite a compreensão da gravidade descrita nas diversas publicações sobre endometriose, há lacunas importantes nesta classificação como, por exemplo, a falta de informação acerca de formas graves da doença urinária e intestinal (Averbach et al., 2005, Abrão et al., 2006). Desta forma, a observação proposta por Nisolle & Donnez, em 1997, dividindo a doença em três entidades distintas, incluindo principalmente a endometriose infiltrativa profunda neste quesito, amplia didaticamente o modo de se discutir a extensão e a gravidade da endometriose.

Além disso, a análise histológica da endometriose (Abrão et al., 2003) traz a possibilidade de observarem-se as características das lesões, comparativamente ao endométrio tópico, e alcançar dados prognósticos. A somatória destes três parâmetros permite inserir cada caso em seu real aspecto clínico, sendo importante salientar a ausência de estudos que depuraram a análise de pacientes com endometriose no formato em questão.

Em relação ao estadiamento e à classificação histológica da endometriose, nosso estudo não observou diferenças significativas quanto às concentrações de citocinas e ao tipo de resposta Th1 e Th2. Keenan et al. (1994) coletaram fluido peritoneal de 62 mulheres durante cirurgia laparoscópica por doenças ginecológicas benignas e isolaram macrófagos peritoneais para submetê-los a cultura por 24 horas. Concluíram que a secreção de IL-6 por macrófagos peritoneais estava elevada nas pacientes com endometriose e se relacionou com o estágio da doença. O IFN-gama não apresentou alterações significativas. Esses dados são concordantes com os obtidos em nosso estudo.

Quanto ao TNF-alfa, resultado diferente do observado em nossa análise foi registrado por Pizzo et al. (2002) em estudo com número restrito de casos. Foram

comparados dois grupos de pacientes, com (26 casos) e sem (5 casos) endometriose, havendo elevação de TNF-alfa e TGF-beta no sangue e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose quando comparadas ao grupo controle. O TNF-alfa apresentou decréscimo nos estádios mais avançados da doença. Outro estudo observou concentrações elevadas de TNF-alfa e IL-6 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, sem haver relação com o estágio da doença, mas sim com a presença de lesões vermelhas glandulares (Iwabe et al., 2002). Por fim, Richter et al. (2005.) analisando a dosagem do TNF-alfa no fluido peritoneal de 100 pacientes, das quais 35 com pelve normal e 65 com endometriose, obtiveram resultados significativos: as concentrações médias desta citocina no grupo controle foram de 6,2 pg/ml, no grupo com endometriose estádios I/II, 56,33 pg/ml e no grupo com endometriose estádios III/IV, 200,15 pg/ml.

Um estudo envolvendo a IL-10 em casos de doença avançada demonstrou elevação desta citocina no fluido peritoneal de pacientes com este tipo específico de endometriose (Tabibzadeh et al., 2003) De modo diverso, na presente análise, a IL-10 se apresentou mais elevada no fluido peritoneal de pacientes com endometriose no ovário, porém sem doença profunda, independente da presença de lesões peritoneais.

Os dados estatísticos não demonstraram haver diferenças significativas nas concentrações das citocinas nos casos de endometriose profunda. No entanto, conforme as informações descritas, parece haver tendência para se cogitar a hipótese da participação mais efetiva do padrão de resposta Th1 nestes casos, pois:

- na primeira análise das citocinas isoladamente, o IFN-gama mostrou-se elevado no fluido peritoneal e, ao se verificar quais casos estavam alterados, foi possível observar que 9 de 13 pacientes (69,2%) que apresentaram IFN-gama elevado, eram portadoras de endometriose profunda;
- foi encontrada elevação do TNF-alfa nas pacientes do Grupo A com dispareunia de profundidade quando comparadas ao Grupo B, sendo que entre as

pacientes com endometriose que referiam dispareunia de profundidade (n=32), 65,5% tinham a forma infiltrativa profunda da doença;

- as pacientes com endometriose que referiam quadro de infertilidade possuíam concentrações de IL-2 mais elevadas do que as pacientes sem endometriose; entre o total de pacientes com infertilidade e endometriose (n=22), 63.6% (n=14) revelaram endometriose profunda.

O único estudo disponível na literatura relativo a este tema não obteve resultados passíveis de discussão, pois analisou o perfil de citocinas (IL-6, TGFbeta, IFN-gama, TNF-alfa e IL-10) em apenas 13 pacientes (D'Hooghe et al., 2001).

Perspectivas

Entender a etiopatogenia de uma doença significa abrir um leque de alternativas clínicas que podem atingir o principal objetivo da Medicina: a cura de um paciente. A endometriose é uma doença de perfil ímpar e o objetivo de seu tratamento depende da manifestação da dor e/ou da infertilidade. O presente estudo pressupõe e sugere conclusões que uma linha de pesquisa fértil neste tópico passa pelas terapêuticas imuno-moduladoras (D'Hooghe et al., 2003; Olive et al., 2004; Fedele et al., 2004).

O tratamento clínico clássico para a endometriose se baseia na supressão hormonal ovariana, no sentido de criar um ambiente hipoestrogênico que produza atrofia dos focos da doença de forma semelhante ao induzido no endométrio tópico (Petta et al., 2005). No entanto, o uso prolongado de determinadas drogas, como os análogos do GnRH, pode trazer efeitos indesejados; a suspensão do tratamento, em geral, conduz a recorrência dos sintomas e as pacientes com desejo reprodutivo não se beneficiam pela própria ação inibidora da ovulação da maioria destes medicamentos (Kennedy et al., 2005).

Ao se estabelecer a via preferencial de resposta Th1/Th2 na endometriose, as drogas imuno-moduladoras poderiam direcionar este processo. Um exemplo deste mecanismo envolve a tuberculose, infecção causada pela *Mycobacterium*

tuberculosis, grave problema de saúde mundial com estimativa de 7.5 milhões de casos por ano, sendo 95% nos países em desenvolvimento. Na falta de produção de IFN-gama (resposta Th1), a doença tem curso rápido e fatal, não havendo dúvida que a resposta imune efetiva contra o bacilo requer atuação da via Th1. Em 2002, estudo envolvendo países africanos e europeus analisou as dosagens das citocinas envolvidas nestas respostas; os dados obtidos revelaram que os marcadores da resposta Th2 diminuíram em 30% após 2 a 3 meses de tratamento e quase 70% após o final do tratamento em relação aos pacientes controles sadios. Este resultado demonstrou que a cura da tuberculose se associa à mudança da resposta imune para uma atividade maior da resposta Th1 e menor da resposta Th2 (Lienhardt et al., 2002).

Neste sentido, embora o TNF-alfa tenha participação fundamental no sistema imune, quando presente em excesso pode trazer conseqüências indesejadas como, por exemplo, em pacientes com artrite reumatóide. Com este raciocínio, drogas antagonistas do TNF-alfa, como etanercept, infliximabe e adalimumab, foram desenvolvidas, havendo atualmente mais de meio milhão de pessoas utilizando este tipo de tratamento (Khanna et al., 2004). Os estudos da aplicabilidade destas substâncias têm se multiplicado para outras situações clínicas severas como doença de Chron e espondilite anquilosante, havendo a sugestão para se iniciar estudos em casos graves de endometriose (Bullimore, 2003).

O TNF-alfa estimula as enzimas matriz metaloproteinases (MMPs), presentes no foco de endométrio ectópico, favorecendo o implante dos mesmos (Sillem et al., 1998). As drogas que inibem a ação desta citocina poderiam bloquear a ligação com essas enzimas, o que impediria a adesão do tecido endometrial à superfícies ectópicas, havendo desta forma a racionalidade para o uso deste tratamento em pacientes com endometriose (Nothnick & D'Hooghe, 2003). Um estudo experimental foi realizado em 12 macacas com endometriose peritoneal espontânea, aplicando-se etanercept em 8 animais e água em 4, por via subcutânea, durante 8 semanas. Os autores observaram diminuição significativa

na superfície peritoneal doente do grupo de macacas tratadas com a medicação (Barrier et al., 2004).

Deste modo, a continuação desta pesquisa, seja aumentando o número de pacientes avaliadas, assim como em conjunto com outras análises que podem ser conduzidas com o mesmo material coletado que avaliem outros dados relativos à resposta imune de pacientes com endometriose, pode trazer informações relevantes ao entendimento de questões básicas desta doença que irão proporcionar a busca de alternativas consistentes na prática clínica.

7. ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento pós-informação.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO**

(Obrigatório Para Pesquisas Científicas em Seres Humanos - Resolução Nº 01 de 13.6.1988 - CNS)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE: _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO: M F X DATA NASCIMENTO: __/__/__
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO: M F X DATA NASCIMENTO: __/__/__
ENDEREÇO: _____ Nº _____ APTO _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação de marcadores biológicos no sangue e fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose.

2. PESQUISADOR: Sérgio Podgaec

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pós-Graduando INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 72644

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: SEM RISCO RISCO MÍNIMO
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano RISCO MÉDIO X RISCO MAIOR
como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA: 601/03

5. DURAÇÃO DA PESQUISA: .2 anos

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Justificativa e objetivos da pesquisa: para o tratamento da sua doença, a senhora terá que ser submetida a uma cirurgia. O objetivo deste estudo é avaliar se a coleta de sangue de seu braço e de líquido que existe em seu abdome no início da cirurgia pode ajudar no diagnóstico e tratamento da sua doença que se chama endometriose.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: conforme comentado acima, a senhora será submetida a cirurgia e também a coleta de sangue do braço e de líquido do abdômen durante esta cirurgia.

3. Desconfortos e riscos esperados: durante a cirurgia podem ocorrer complicações, já que a senhora estará anestesiada, mas, conforme comentado, sua doença exige esta cirurgia. Todo o procedimento da pesquisa será realizado enquanto a senhora estiver anestesiada. Os desconfortos podem ocorrer depois, como: dor no local da cirurgia, fraqueza, vômito (pela anestesia), infecção no corte e hematoma (mancha roxa na pele).

4. Benefícios que poderão ser obtidos: com esta pesquisa da qual a senhora está participando, tentamos descobrir se com os exames de sangue e do líquido de seu abdome poderíamos evitar a cirurgia nos casos de endometriose.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: não há.

6. Esclarecimento sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo:

X Sim **Não**

7. Esclarecimento sobre a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do seu cuidado e tratamento:

X Sim **Não**

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

X Sim **Não**

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

X Sim **Não**

10. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP:

X Sim **Não**

11. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: _____

IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, ____ de _____ de 20__.

assinatura do paciente ou responsável legal

(carimbo ou nome Legível)

assinatura do pesquisador que obteve o
consentimento

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

Anexo 2: Idade, dia do ciclo menstrual (relativo às coletas de sangue e fluido peritoneal) e quadro clínico das pacientes do Grupo A (com endometriose).

Iniciais	Idade	Dia do ciclo	Dismenorréia	Dispareunia	Dor acíclica	Infertilidade	Alteração intestinal	Alteração urinária
CFO	37	5	sim	não	sim	não	não	Não
SMM	32	3	sim	não	sim	não	sim	Não
FMO	18	4	sim	não	sim	não	não	Não
COM	34	2	não	não	não	sim	não	Não
MSQM	26	9	sim	sim	não	não	não	Não
AR	23	3	não	sim	não	não	não	Não
MLOSC	40	13	sim	sim	sim	não	sim	Não
CAC	27	10	não	sim	sim	sim	sim	Não
SVFB	39	7	não	não	sim	sim	sim	Não
RCA	30	5	sim	não	não	não	não	Não
DRD	33	27	sim	sim	sim	sim	sim	Não
ST	30	1	não	não	sim	não	não	Não
LPM	28	5	sim	não	não	não	sim	Não
FCSSD	25	3	sim	sim	não	não	sim	Não
SAW	29	16	sim	não	sim	não	não	Não
MIRCB	30	1	não	sim	sim	não	não	Não
JCP	25	13	sim	sim	não	não	não	Não
FAG	30	14	não	sim	não	não	não	Não
IMS	26	2	não	não	sim	não	não	Não
CRB	39	9	sim	sim	sim	não	sim	Não
VMF	36	8	não	não	não	sim	não	Não
APMJ	31	5	sim	sim	não	não	não	Não
FF	31	4	não	sim	não	não	não	Não
PRLG	38	8	não	não	não	sim	não	Não
RCSS	39	2	não	não	sim	sim	não	Não
VCPS	28	5	sim	não	não	sim	não	Não
VIS	23	4	não	não	sim	não	não	Não
DFSR	26	4	sim	não	sim	não	sim	Não
TIL	35	7	não	não	não	não	não	Não
BDM	29	11	sim	não	não	não	sim	Sim
VPSC	24	7	sim	não	sim	não	não	Não
RS	29	6	sim	sim	sim	não	não	Não
TCB	22	3	sim	sim	sim	não	não	Não
MASS	34	24	sim	não	sim	não	não	Não
AECSF	37	2	sim	sim	sim	não	sim	Não
RGP	31	3	sim	não	não	não	não	Não
CEM	33	10	sim	sim	sim	não	sim	Não
HMBV	40	11	não	sim	sim	não	sim	Não
MCCS	38	2	não	não	sim	não	não	Não
JJ	20	24	sim	não	não	não	não	Não
MNNS	35	3	sim	sim	não	sim	sim	Não
CG	40	3	sim	sim	não	sim	sim	Não
ITPS	40	8	sim	não	sim	não	não	Não
HOC	37	26	sim	não	não	não	sim	Não

Iniciais	Idade	Dia do ciclo	Dismenorréia	Dispareunia	Dor acíclica	Infertilidade	Alteração intestinal	Alteração urinária
ASF	27	7	sim	sim	sim	sim	sim	Não
ASS	36	2	sim	não	não	não	sim	Não
CN	35	19	sim	sim	sim	sim	sim	Não
LMJ	37	17	não	sim	não	sim	não	Não
JZP	40	17	sim	não	não	sim	sim	Não
STK	34	3	não	sim	não	sim	não	Não
LGRC	30	9	sim	sim	sim	sim	sim	Não
CK	33	6	não	sim	não	não	sim	Não
SF	33	1	sim	sim	sim	não	sim	Não
MHTS	39	9	sim	sim	sim	sim	sim	Não
JGD	36	3	sim	não	sim	não	sim	Não
AAS	31	6	não	não	sim	não	sim	Não
ECAH	36	2	sim	sim	sim	sim	não	Não
EAS	32	8	sim	não	sim	não	sim	Não
NJM	37	3	sim	sim	sim	sim	sim	Não
CR	31	6	não	não	não	sim	não	Não
MSV	33	22	não	não	sim	não	não	Não
TG	29	9	sim	sim	sim	não	sim	Não
MAT	35	1	não	sim	sim	sim	sim	Sim
KNML	29	4	sim	não	sim	sim	sim	Não
SVEG	37	3	sim	sim	sim	não	sim	Não

Anexo 3: Idade, dia do ciclo menstrual (relativo às coletas de sangue e fluido peritoneal) e quadro clínico das pacientes do Grupo B (sem endometriose).

Iniciais	Idade	Dia do ciclo	Dismenorréia	Dispareunia	Dor acíclica	Infertilidade	Alteração intestinal	Alteração urinária
MELS	33	9	não	não	não	não	sim	não
EBMM	27	4	sim	não	não	sim	não	não
LMMC	28	12	sim	não	não	não	não	não
AAP	33	10	sim	não	não	não	não	não
SCMB	30	4	não	sim	sim	não	não	não
ETS	29	8	sim	não	não	não	sim	não
PSS	24	19	sim	não	não	sim	sim	sim
MPMF	37	7	sim	não	sim	sim	não	não
LFM	38	26	sim	não	não	sim	não	não
MHBC	40	9	sim	não	não	não	não	não
FGBM	36	4	sim	não	sim	sim	não	não
LAS	36	5	não	não	não	sim	não	sim
NQM	34	2	não	não	não	sim	não	não
SRRBS	36	26	sim	não	não	não	não	não
VHS	28	5	sim	não	não	não	não	não
RGC	38	5	sim	não	não	não	não	não
MLC	28	3	sim	não	não	não	não	não
RSA	37	1	sim	não	não	sim	não	não
LRSC	40	9	não	sim	sim	sim	não	não
JMX	36	21	sim	não	não	não	sim	não
ACVB	32	10	sim	não	não	não	não	não
PLS	27	10	sim	não	sim	não	não	não
MSM	40	2	não	sim	sim	sim	não	não
CARS	37	27	sim	não	não	não	sim	não
AMSS	32	15	não	sim	sim	não	não	não
MSS	39	28	não	sim	sim	não	não	não
DPS	21	17	não	sim	sim	não	sim	não
MA	26	6	não	sim	não	não	não	não
TRCS	34	5	sim	não	não	sim	não	não
YT	38	3	não	sim	sim	sim	não	não
JAS	29	3	sim	não	sim	não	não	não
MAS	34	8	não	sim	sim	sim	sim	não
EGMA	27	5	sim	não	não	não	sim	não

Anexo 4: Pacientes do Grupo A (com endometriose) divididas pelo estadiamento da endometriose segundo a *American Society for Reproductive Medicine* (1986), local de acometimento da doença (peritônio, ovário e doença profunda) e tipo histológico da endometriose observado nas biópsias obtidas durante o procedimento cirúrgico.

Iniciais	Estádio	Peritônio	Ovário	Profunda	Tipo histológico
CFO	1	sim	não	não	E
SMM	1	sim	não	não	E + M
FMO	1	não	sim	não	E + BD
COM	1	sim	não	não	BD
MSQM	1	sim	não	não	E + BD
AR	1	sim	não	não	E + BD
MLOSC	1	sim	não	não	E + M
CAC	1	sim	não	não	E+M
SVFB	1	sim	não	não	E+M
RCA	2	não	sim	não	E + I
DRD	2	sim	sim	não	E + M
ST	2	não	sim	não	E + BD
LPM	2	sim	sim	não	E + M
FCSSD	2	não	sim	não	E + BD
SAW	2	não	sim	não	E
MIRCB	2	sim	não	sim	E + I
JCP	2	não	sim	não	E + BD
FAG	2	sim	não	não	E
IMS	2	não	sim	não	E + BD
CRB	2	não	sim	não	E
VMF	2	sim	não	não	E + BD
APMJ	2	sim	não	não	E + BD
FF	2	sim	sim	não	E + BD
PRLG	2	não	sim	não	E + BD
RCSS	2	não	sim	não	E+M
VCPS	2	sim	não	não	E+BD
VIS	2	não	sim	não	E+M
DFSR	2	sim	não	sim	E+BD
TIL	3	não	sim	sim	E + BD
BDM	3	não	sim	não	E + M
VPSC	3	não	sim	não	E + BD
RS	3	não	não	sim	E+M
TCB	3	não	sim	não	E+M
MASS	3	sim	sim	não	E+M
AECSF	3	sim	sim	sim	E+BD
RGP	4	sim	sim	sim	E + M
CEM	4	não	sim	sim	E + BD
HMBV	4	não	sim	sim	E + I
MCCS	4	não	sim	sim	E + M
JJ	4	sim	sim	sim	E + I
MNNS	4	não	não	sim	E + M

Iniciais	Estádio	Peritônio	Ovário	Profunda	Tipo histológico
CG	4	não	sim	sim	E + M
ITPS	4	não	sim	sim	E + BD
HOC	4	não	não	sim	E + BD
ASF	4	não	sim	sim	E + M
ASS	4	sim	sim	não	E + M
CN	4	não	sim	sim	E + M
LMJ	4	sim	sim	sim	E + M
JZP	4	sim	sim	sim	E + M
STK	4	não	sim	sim	E + M
LGRC	4	sim	sim	sim	E + M
CK	4	não	não	sim	E + M
SF	4	sim	sim	sim	E + M
MHTS	4	não	não	sim	E + M
JGD	4	não	não	sim	E + M
AAS	4	não	não	sim	E+M
ECAH	4	não	sim	sim	E+M
EAS	4	não	sim	sim	E+BD
NJM	4	sim	sim	sim	E+M
CR	4	não	não	sim	E+M
MSV	4	sim	sim	sim	E+BD
TG	4	sim	não	sim	E+M
MAT	4	não	não	sim	E+M
KNML	4	não	sim	sim	E+M
SVEG	4	não	não	sim	E+M

Legenda: E – padrão estromal, BD – padrão bem diferenciado, M – padrão misto, I – padrão indiferenciado (classificação descrita na seção Pacientes e Métodos)

Anexo 5: Concentrações em pg/ml das citocinas analisadas no sangue e no fluido peritoneal das pacientes do Grupo A (com endometriose).

Iniciais	TNF-alfa Sangue	INF-gama Sangue	IL-2 Sangue	IL-4 Sangue	IL-10 Sangue	TNF-alfa FP	INF-gama FP	IL-2 FP	IL-4 FP	IL-10 FP
CFO	3.9	6.8	6,3	3.7	4	ind	ind	ind	Ind	10
SMM	7.7	5.2	16,4	3.4	8.9	ind	ind	ind	Ind	7,6
FMO	5.8	6.2	11,6	3.1	3	ind	ind	ind	Ind	ind
COM	ind	2.3	10,2	1.6	2.3	4,8	ind	Ind	Ind	6,9
MSQM	ind	1.9	ind	2.3	2.7	7,4	3,4	3,5	Ind	25,2
AR	3.4	2.1	ind	3.6	2.7	3,3	ind	2,8	241,3	449,2
MLOSC	6.9	4	10,6	4.4	4.2	3,9	ind	2,7	Ind	13
CAC	3,8	ind	2,8	ind	1,9	2,1	ind	1,9	2,3	15,1
SVFB	ind	ind	ind	ind	2,5	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
RCA	6.4	6.1	8,9	2.8	3	ind	ind	Ind	1,2	16,8
DRD	4.9	6.3	12,1	3.4	2.8	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
ST	11.5	10.3	25,5	5.4	6.1	ind	ind	ind	Ind	97,1
LPM	6.6	1.6	10,5	2	3.3	ind	ind	ind	Ind	53,5
FCSSD	5.5	1.4	19,4	4.1	4	ind	ind	ind	Ind	101.8
SAW	3.7	ind	10,5	ind	3.2	10,1	3,3	3,1	1,6	62,7
MIRCB	ind	ind	10,2	1.9	2	3,8	ind	4,3	1,4	6,9
JCP	5.1	2.3	27	1.8	3.1	11,3	2,7	5,6	2,4	14,3
FAG	4	2	8,3	2.4	1.8	4,9	ind	ind	Ind	18,7
IMS	5.6	ind	7,8	1.9	3.2	8,9	ind	6,1	2,4	277,3
CRB	2.3	1.3	7,4	1.3	2.4	7,2	ind	5,4	2,8	15,9
VMF	1.3	3.7	ind	1.6	4	4,8	5,6	3,7	2,1	15,9
APMJ	1.3	3.7	ind	2.1	2	ind	ind	ind	22,9	111,3
FF	ind	ind	7,8	ind	5.7	2,4	ind	2,8	5,4	772,5
PRLG	ind	1.5	10,4	3.1	2.5	ind	ind	ind	Ind	25,7
RCSS	1,7	ind	ind	ind	1,9	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
VCPS	6.4	2.4	ind	2.4	2.5	1,6	ind	2,9	587,9	202,4
VIS	ind	ind	ind	ind	ind	4,2	ind	ind	Ind	15,5
DFSR	ind	ind	ind	ind	1,4	3,8	2,3	ind	5,6	28
TIL	1.5	1.6	8,3	2.4	6.6	6,3	ind	ind	2,3	26
BDM	3.1	1.5	9,1	2.8	3.7	8,7	2,3	4,6	16,7	114,4
VPSC	4.1	3.3	33	2.3	3.9	3,4	ind	ind	6,1	219,5
RS	2,4	ind	ind	ind	1,8	2,2	ind	ind	Ind	115,5
TCB	1,8	ind	ind	ind	2,4	1,8	ind	ind	13	46,7
MASS	1,4	ind	ind	ind	1,8	ind	ind	ind	Ind	1,9
AECSE	1,9	ind	3,4	ind	3,5	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
RGP	6.2	6.6	17	3.9	3.5	ind	ind	ind	2,3	174,9
CEM	ind	2.8	19,4	ind	3.3	3,4	1,7	ind	1,5	28,6
HMBV	7.5	5.5	18,7	4.3	4.5	ind	1,7	ind	1,7	5,6
MCCS	6.7	6	17,5	2.6	4.3	ind	ind	ind	Ind	10,3
JJ	9.6	6.5	25,5	2.8	4.1	ind	ind	ind	Ind	449,4
MNNS	2.7	1.4	8,7	1.3	1.4	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
CG	3.7	2.8	16,5	ind	8.9	ind	ind	ind	Ind	>5000
ITPS	5.6	11.7	34	6.3	6.2	ind	ind	ind	Ind	55,9

HOC	ind	1.4	ind	ind	1.5	30,3	ind	50,6	38,1	5,9
Iniciais	TNF-alfa	INF-gama	IL-2	IL-4	IL-10	TNF-alfa	INF-gama	IL-2	IL-4	IL-10
	Sangue	Sangue	Sangue	Sangue	Sangue	FP	FP	FP	FP	FP
ASF	2.3	ind	7	1.7	2.2	2,3	ind	Ind	9,8	181,6
ASS	5.2	ind	ind	ind	4.5	2,4	ind	2,7	Ind	115,5
CN	2	ind	5,6	1.7	ind	7,5	1,7	4,2	33,9	53,4
LMJ	5,7	1,8	2,3	3,6	2,4	3,2	ind	1,5	2,3	25,7
JZP	4	1.8	6,1	2.4	3.8	6,3	3,8	7,1	3	56,3
STK	ind	1.5	11,6	ind	3.3	4,8	ind	5,1	1,4	45,8
LGRC	ind	ind	2,9	ind	3.8	7,5	2,5	5,2	2,2	272,3
CK	4.8	3.8	12,8	2.6	4.8	8,8	3,4	2,4	2,3	30,9
SF	ind	1.7	6	1.9	4.3	1,8	ind	Ind	1,9	26,2
MHTS	4.8	3	9,5	3.8	6.4	7,2	2	Ind	Ind	23
JGD	ind	ind	ind	ind	ind	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
AAS	3.2	2.1	ind	1.2	3.6	ind	ind	Ind	Ind	11,3
ECAH	1.7	1.8	20,3	1.7	12.9	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
EAS	ind	ind	6,1	2.3	5.7	4,5	ind	Ind	Ind	160,8
NJM	2.3	3	8,8	2.5	3.8	3,2	ind	2,9	2,1	46,3
CR	2.3	3	ind	6.3	4.1	ausente	ausente	ausente	Ausente	ausente
MSV	2	ind	ind	ind	ind	3,1	ind	ind	Ind	21,6
TG	1,5	ind	ind	29,8	4,9	ind	ind	ind	27,6	40,4
MAT	1,4	ind	ind	ind	1,8	266,3	211,3	226	121,1	200,6
KNML	1,7	ind	ind	ind	1,9	ind	ind	Ind	2192	ind
SVEG	ind	ind	ind	ind	2,4	2,6	ind	Ind	2	4,4

Legenda: FP – fluido peritoneal, ind – indeterminado, ausente – ausência de fluido peritoneal na pelve da paciente

Anexo 6: Concentrações em pg/ml das citocinas analisadas no sangue e no fluido peritoneal das pacientes do Grupo B (sem endometriose)

Iniciais	TNF-alfa Sangue	INF-gama Sangue	IL-2 Sangue	IL-4 Sangue	IL-10 Sangue	TNF-alfa FP	INF-gama FP	IL-2 FP	IL-4 FP	IL-10 FP
MELS	9,6	6	9,2	2,8	3,3	ind	ind	ind	ind	46,1
EBMM	8,3	6,5	17,7	2,6	3	ind	ind	ind	ind	7,7
LMMC	6,8	5,6	11,4	3,8	3,1	ind	ind	ind	ind	37,9
AAP	7,6	6,3	12,1	3,1	4,2	ind	ind	ind	1,6	10
SCMB	6,3	7	14,9	2,9	3,3	ind	ind	ind	241,8	52,1
ETS	8,4	6,6	14,6	2,5	5,1	ind	ind	ind	ind	3,7
PSS	8,8	5,6	10,9	3,1	3,3	ind	ind	ind	ind	31,3
MPMF	10,4	6,3	6,1	3,4	3,9	1,8	ind	ind	ind	6,6
LFM	6,4	2,4	11,9	2	4	ind	ind	ind	1,8	77
MHBC	1,9	ind	4,3	ind	3,9	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
FGBM	ind	ind	ind	ind	ind	4,9	ind	ind	ind	9,8
LAS	3,5	ind	5,2	1,3	1,8	6,2	ind	ind	ind	30
NQM	ind	1,8	9,7	ind	1,7	1568	ind	35,4	298,3	5,9
SRRBS	3,7	ind	8,3	ind	7,5	6,2	ind	ind	ind	30
VHS	4,9	1,7	6,5	1,6	3,7	7,5	3,4	6,2	2,8	5,2
RGC	ind	3,7	11,1	2,4	2	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
MLC	ind	ind	7,5	ind	2	ind	ind	ind	1,8	12,2
RSA	ind	1,6	2,5	2,7	2,7	ind	2	ind	ind	42,8
LRSC	2,9	ind	9,6	3	6	4,8	ind	3,2	215	65,8
JMX	ind	ind	2,5	1,5	2,5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
ACVB	ind	ind	3,4	1,6	2,8	1,9	ind	ind	ind	9,2
PLS	5,1	1,7	9,3	2,9	3	12,1	ind	ind	ind	58,2
MSM	5,6	3	12,3	3,8	6,5	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
CARS	ind	ind	ind	ind	1,2	ind	ind	ind	41,7	30,1
AMSS	3,2	2,1	9,3	2	1,5	2,1	ind	ind	ind	10,8
MSS	4,6	2,4	6,6	2	4,9	20,7	ind	2,2	ind	5,8
DPS	4,4	2,5	2,9	4,1	6,9	4	ind	2,4	14,9	23
MA	2,7	2,3	8	4,1	3,7	5,1	ind	2	ind	25,7
TRCS	3,2	2,1	11,9	ind	3	1,4	ind	ind	66,3	51,4
YT	4,8	2,4	26	3,2	5,2	ind	ind	ind	773,1	>5000
JAS	2,5	ind	ind	ind	1,9	ind	ind	ind	1,8	3,2
MAS	1,8	ind	ind	ind	2,4	7,4	ind	ind	8,4	92,7
EGMA	3,9	ind	ind	ind	2,9	ind	ind	ind	1,5	27,9

Legenda: FP – fluido peritoneal, ind – indeterminado, ausente – ausência de fluido peritoneal na pelve da paciente

6. CONCLUSÕES

1. Pacientes com endometriose apresentaram:

a) predomínio do padrão de resposta Th2 sobre o Th1 quando comparadas às pacientes sem a doença;

b) concentrações mais elevadas de interferon-gama e interleucina-10 no fluido peritoneal em relação às pacientes sem endometriose;

c) concentrações mais elevadas do fator de necrose tumoral-alfa sérico quando havia dispareunia de profundidade em relação às pacientes sem endometriose que também referiam este sintoma;

d) concentrações mais elevadas da interleucina-2 no fluido peritoneal quando havia infertilidade em relação às pacientes sem endometriose que também referiam este sintoma,;

e) concentrações mais elevadas da interleucina-10 na presença de doença ovariana e na ausência da forma infiltrativa profunda, independente da ocorrência de focos peritoneais, quando comparadas às pacientes com endometriose, porém sem doença ovariana e aquelas sem endometriose.

2. Pacientes com endometriose não apresentaram diferenças significantes nas concentrações de citocinas quanto ao estadiamento e à classificação histológica da doença.

8. REFERÊNCIAS

-
01. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383:787-93.
 02. Abrao MS, Dias Jr JA, Podgaec S, Carvalho FM, Averbach M. Bowel endometriosis and schistosomiasis: a rare but possible association. *Fertil Steril*. 2006;85:1060. e1-2.
 03. Abrão MS, Podgaec S, Izzo CR, Melo PV, Porto RC, Ramos LO, Pinotti JA. Perfil epidemiológico e clínico da endometriose: análise de 180 casos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1995;17: 779-84.
 04. Abrao MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*. 1997;12:2523-7.
 05. Abrão MS, Podgaec S, Dias Jr JA. Histórico e aspectos epidemiológicos da endometriose: uma doença prevalente e de conhecimento antigo. In: Abrão MS, editor. *Endometriose uma visão contemporânea*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.1-12.
 06. Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;82:31-40.
 07. Adler A, Levy Y, Roth A, Wexler D, Keren G, George J. Functional T-lymphocyte dichotomy in the peripheral blood of patients with unstable angina. *Int J Cardiovasc Intervent*. 2005;7:146-51.
 08. Alviggi C, Carrieri PB, Pivonello R, Scarano V, Pezzella M, De Placido G, Colao A, Matarese G. Association of pelvic endometriosis with alopecia universalis, autoimmune thyroiditis and multiple sclerosis. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:182-9.
 09. 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;84:1705-11.
 10. Arici A. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:101-9.
-

11. Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Vassiliadis S, Mahutte NG. Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2003;80:889-94.
12. Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med*. 2005;7:229-42.
13. Averbach M, Abrao M, Podgaec S, Correa P. Rectal endometriosis. *Gastrointest Endosc*. 2005;62:978-9.
14. Badawy SZ, Cuenca V, Stitzel A, Tice D: Immune rosettes of T and B lymphocytes in infertile women with endometriosis. *J Reprod Med*. 1987;32:194-97.
15. Barrier BF, Bates GW, Leland MM, Leach DA, Robinson RD, Propst AM. Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy in the treatment of spontaneous endometriosis in baboons. *Fertil Steril*. 2004;81:775-9.
16. Bastos AC. Ciclo menstrual e suas alterações. In: Bastos AC, editor. *Noções de Ginecologia*. São Paulo: Atheneu; 1994. p.56-8.
17. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers. *Hum Reprod*. 2002;17:426-31.
18. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Ativação e função dos linfócitos T e B. In: Benjamini E, Coico R, Sunshine G, editores. *Imunologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.11-25.
19. Bergqvist A; Bruse C; Carlberg M, Carlstrom K. Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril*. 2001;75:489-95.
20. Berkkanoglu M, Arici A. Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50:48-59.
21. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science*. 2005;308:1587-9.
22. Braun DP, Ding J, Dmowski WP. Peritoneal fluid-mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor

- necrosis factor-alpha in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;78:727-32.
23. Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha. *Med Hypotheses*. 2003;60:84-8.
24. Chapron C, Chopin N, Borghese B, Malartic C, Decuyper F, Foulot H. Surgical management of deeply infiltrating endometriosis: an update. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1034:326-37.
25. Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticlebased flow cytometric technology. *Clin Chem*. 1999;45:1693.
26. Cook EB, Stahl JL, Lowe I, Chen R, Morgan E, Wilson J, Varro R, Chan A, Graziano FM, Barney NP. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J Immunol Methods*. 2001;254:109-18.
27. Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990;53:978-83.
28. Crosignani PG, Luciano A, Ray A, Bergqvist A. Subcutaneous depot medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Hum Reprod*. 2005;21:2311-7.
29. Darai E, Marpeau O, Thomassin I, Dubernard G, Barranger E, Bazot M. Fertility after laparoscopic colorectal resection for endometriosis: preliminary results. *Fertil Steril*. 2005;84:945-50.
30. D'Hooghe TM. Immunomodulators and aromatase inhibitors: are they the next generation of treatment for endometriosis? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003;15:243-9.
31. D'Hooghe TM, Xiao L, Hill JA. Cytokine profiles in autologous peritoneal fluid and peripheral blood of women with deep and superficial endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2001;265:40-4.

-
32. Dias Jr JA, Oliveira RM, Podgaec S, Abrão MS. Endometriosis and immunology: is the dosage of the natural killer cells relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;123:14.
 33. Dmowski WP, Rana N, Michalowska J, Friberg J, Papierniak C, El-Roeiy A. The effect of endometriosis, its stage and activity of autoantibodies in in vitro fertilization and embryo transfer success rates. *Fertil Steril.* 1995;63:555-62.
 34. Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997;24:235-58.
 35. Everitt BS. *The analysis of contingency tables.* London: Chapman; 1977.
 36. Fauconnier A, Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update.* 2005;11:595-606.
 37. Fedele L, Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2004;9:167-77.
 38. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-95.
 39. Gazvani R, Bates M, Vince G, Christmas S, Lewis-Jones I, Kingsland C. Concentration of interleukin-12 in the peritoneal fluid is not influenced by the presence of endometriosis, its stage or the phase of the menstrual cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80:175-8.
 40. Gazvani MR, Bates MD, Vince GS, Christmas SE, Lewis-Jones DI, Kingsland CR. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-4 in relation to the presence of endometriosis, its stage and the phase of the menstrual cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80:361-3.
 41. Ginsburg ES, Xiao L, Gargiulo AR, Kung FT, Politch JA, Schust DJ, Hill JA. T-helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2005;83:1659-64.
 42. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 2004;364:1789-99.

-
43. Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol.* 1987;70:115–22.
 44. Goldsmith MA, Greene WC. *The cytokine handbook*. 2nd ed. New York: Ed. Thomson A; 1994. p. 57-67.
 45. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril.* 2001;76:1-10.
 46. Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, Terakawa N. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:593-7.
 47. Hemmings R, Rivard M, Olive DL, Poliquin-Fleury J, Gagne D, Hugo P, Gosselin D. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;8:1513-21.
 48. Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1988;50:216–22.
 49. Ho HN, Wu MY, Chao KH, Chen CD, Chen SU, Yang YS. Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1997;12:2528-33.
 50. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 1997;67:1059-64.
 51. Ijzermans JN, Marquet RL. Interferon-gamma: a review. *Immunobiology.* 1989;179:456-73.
 52. Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;53:19-25.
 53. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikwa M, Terakawa N. Tumor necrosis factor- α promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:824–9.
 54. Keenan JA; Chen TT; Chadwell NL; Torry DS; Caudle MR. Interferon-gamma and interleukin-6 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1994;32:180-3.
-

-
55. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20:2698-704.
 56. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Hamasaki T, Kitajima M, Hasuo A, Miyamura Y, Ishimaru T. Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002;81:764-71.
 57. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Miura S, Sekine I, Ishimaru T. Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006;85:458-66.
 58. Khanna D, McMahon M, Furst DE. Safety of Tumour Necrosis Factor-alpha antagonists. *Drug Saf.* 2004;27:307-24.
 59. Khorram O, Taylor RN, Ryan IP, Schall TJ, Landers DV. Peritoneal fluid concentrations of the cytokine RANTES correlate with the severity of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:1545-9.
 60. Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A.* 2006;69:353-8.
 61. Koninckx P, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril.* 1992;58: 924-8.
 62. Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chem Immunol Allergy.* 2005;88:64-79.
 63. Lamvu G, Tu F, As-Sanie S, Zolnoun D, Steege JF. The role of laparoscopy in the diagnosis and treatment of conditions associated with chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2004;31:619-30.

-
64. Laufer MR, Goldstein DP. Dysmenorrhea, pelvic pain and the pre-menstrual syndrome. In: Emans SJ, Laufer MR, Goldstein DP, editores. *Pediatric and adolescent gynecology*. New York: Lippincott; 1998. p.363-410.
65. Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukine-1b. *Mol Hum Reprod*. 2000;6:269-75.
66. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001;75:1-10.
67. Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, Bah B, Benagiano M, Diallo A, Manetti R, Manneh K, Gustafson P, Bennett S, D'Elis MM, McAdam K, Del Prete G. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol*. 2002;32:1605-13.
68. Lorencatto C, Petta CA, Navarro MJ, Bahamondes L, Matos A. Depression in women with endometriosis with and without chronic pelvic pain. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85:88-92.
69. Mahnke JL, Dawood MY, Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000;73:166-70.
70. Mathur SP. Autoimmunity in endometriosis: relevance to infertility. *Am J Reprod Immunol*. 2000;44:89-95.
71. Mathur SP, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin (Ig)G, IgA, and IgM responses in endometriosis. *Fertil Steril*. 1990;54:56-63.
72. Mathur SP, Lee JH, Jiang H, Arnaud P, Rust PF. Levels of transferrin and alpha 2-HS glycoprotein in women with and without endometriosis. *Autoimmunity*. 1999;29:121-7.
73. Matsubayashi H, Hosaka T, Sugiyama Y, Suzuki T, Arai T, Kondo A, Sugi T, Izumi S, Makino T. Increased natural killer-cell activity is associated with infertile women. *Am J Reprod Immunol*. 2001;46:318-22.
-

-
74. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996;98:482-9.
 75. Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2006;6:91-6.
 76. Mettler L, Volkov NI, Kulakov VI, Jurgensen A, Parwaresch MR. Lymphocyte subsets in the endometrium of patients with endometriosis throughout the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol.* 1996;36:342-8.
 77. Metzger DA, Haney AF. Etiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989;16:1-14.
 78. Meyer R. Über den Staude der Frage der Adenomyosites Adenomyoma in Allgemeinen und Adenomyonetitis Sarcomatosa. *Zentralbl Gynakol.* 1919;36:745-59.
 79. Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003;30:1-19.
 80. Moro MH, Bjornsson J, Marietta EV. Gestational attenuation of Lyme arthritis is mediated by progesterone and IL-4. *J Immunol.* 2001;166:7404-9.
 81. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW. Two types of murine helper T cell clone: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136:2348-57.
 82. Nishida M, Nasu K, Ueda T, Fukuda J, Takai N, Miyakawa I. Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2005;11:29-34.
 83. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril.* 1997;68:585-96.
 84. Norris PJ, Rosenberg ES. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS.* 2001;15:16-21.
-

-
85. Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril*. 2001;76:223-31.
 86. Nothnick WB, D'Hooghe TM. Medical management of endometriosis: novel targets and approaches towards the development of future treatment regimes. *Gynecol Obstet Invest*. 2003;55:189-98.
 87. Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:319-28.
 88. Organização Mundial de Saúde (OMS). In: *Manual de laboratório para exame de sêmen humano e de interação esperma-muco cervical*. São Paulo: Livraria Editora Santos; 1994. p.46-7.
 89. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*. 1991;56:45-51.
 90. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR. Transforming growth factor-beta activity is increased in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1994;83:287-92.
 91. Ota H, Rong H, Igarashi S, Tanaka T. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis. *Hum Reprod*. 2002;17:1453-8.
 92. Pasoto SG, Abrao MS, Viana VS, Bueno C, Leon EP, Bonfa E. Endometriosis and systemic lupus erythematosus: a comparative evaluation of clinical manifestations and serological autoimmune phenomena. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53:85-93.
 93. Perry R. Endometriosis: a gynaecological and colorectal disease. *N Z Med J*. 2005;118:1535-9.
 94. Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa E Silva JC, Podgaec S, Bahamondes L. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20:1993-8.
-

-
95. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV, Sofo V, Tripepi M, Marisco S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54:82-7.
96. Podgaec S. *Avaliação do CA15-3, CA19-9, CEA, alfa-feto proteína e beta-2 microglobulina em pacientes portadoras de endometriose* [dissertação]..São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.
97. Podgaec S, Abrão MS. Endometriose. In: Fonseca AM, Bagnoli VR, Halbe HW, Pinotti JA, editores. *Ginecologia endócrina*. Atheneu: São Paulo; 2004. p.87-91.
98. Podgaec S, Abrao MS. The role of immunology in the etiopathogenesis, diagnosis and treatment of endometriosis. *Einstein.* 2005;3:203-7.
99. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature.* 1987;326:304-6.
100. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1522-6.
101. Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril.* 1985;43:351-2.
102. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril.* 1997;67:817-21.
103. Richter ON, Dorn C, Rosing B, Flaskamp C, Ulrich U. Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;271:143-7.
104. Romagnani S. Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today.* 1991;12:256-7.
105. Rossi M, Sharkey AM, Vigano P, Fiore G, Furlong R, Florio P, Ambrosini G, Smith SK, Petraglia F. Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells. *Reproduction.* 2005;130:721-9.
-

-
106. Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol*. 1992;4:327-32.
 107. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927;14:422-46.
 108. Schulze-Koops H, Kalden JR. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001;15:677-691.
 109. Seli E, Berkkaoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2003;30:41-61.
 110. Sillem M, Prifti S, Monga B, Arslic T, Runnebau B. Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix protein is enhanced by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;87:123-7.
 111. Simhan HN, Chura JC, Rauk PN. The effect of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 on lipopolysaccharide-stimulated production of prostaglandin E2 by cultured human decidual cells. *J Reprod Immunol*. 2004;64:1-7.
 112. Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS. The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res*. 1999;20:147-61.
 113. Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelas C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006;32:162-170.
 114. Skrzypczak J, Szczepanska M, Puk E, Kamieniczna M, Kurpisz M. Peritoneal fluid cytokines and sICAM-1 in minimal endometriosis: search for discriminating factors between infertility and/or endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;122:95-103.
 115. Steele RW, Dmowski WP, Mormer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1984;6:33-6.

-
116. Tabibzadeh S, Becker JL, Parsons AK. Endometriosis is associated with alterations in the relative abundance of proteins and IL-10 in the peritoneal fluid. *Front Biosci.* 2003;1:70-8.
 117. Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT. Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells: modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol.* 1989;142:3134-9.
 118. Tanaka M, Hirabayashi Y, Gatanaga H. Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4+CD8-T cells. *Scand J Immunol.* 1999;50:550-4.
 119. Thomson JC, Redwine DB. Chronic pelvic pain associated with autoimmunity and systemic and peritoneal inflammation and treatment with immune modification. *J Reprod Med.* 2005;50:745-58.
 120. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature.* 1987;330:662-4.
 121. Ulukus M, Arici A. Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2005;57:237-48.
 122. Vigano P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5730-6.
 123. von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:627-34.
 124. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol.* 1980;23:885-89.
-

-
125. Wheelock EF, Sibley WA. Circulating virus, interferon and antibody after vaccination with the 17-d strain of yellow-fever virus. *N Engl J Med.* 1965;273:194-8.
 126. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril.* 1994;62:1086-8.
 127. Wu MH; Yang BC; Lee YC; Wu PL; Hsu CC. The differential expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and regulation by interferon-gamma during the pathogenesis of endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2004;51:373-80.
 128. Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2003;49:285-96.
 129. Wu MY, Yang JH, Chao KH, Hwang JL, Yang YS, Ho HN. Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2000;74:1187-91.
 130. Wunder DM, Mueller MD, Birkhauser MH, Bersinger NA. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 2005;22:257-64.
 131. Xia N, Zhou S, Liang Y, Xiao C, Shen H, Pan H, Deng H, Wang N, Li QQ. CD4+ T cells and the Th1/Th2 imbalance are implicated in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Int J Mol Med.* 2006;17:911-6.
 132. Zhang X, Lin J, Qian Y, Deng L. Decreased levels of interleukin-18 in peritoneal fluid but not in serum of patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;81:1229-34.
 133. Zheng W, Li N, Wang J, Ulukus EC, Ulukus M, Arici A, Liang SX. Initial endometriosis showing direct morphologic evidence of metaplasia in the pathogenesis of ovarian endometriosis. *Int J Gynecol Pathol.* 2005;24:164-72.