Marici Rached Rached

Papel do HLA-G na endometriose

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rached, Marici Rached

Papel do HLA-G na endometriose / Marici Rached Rached. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Maurício Simões Abrão.

Descritores: 1.Antígenos HLA-G 2.Endometriose 3.Imunomodulação
4.Imunossupressão 5.Tolerância imunológica

USP/FM/DBD-115/17

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rached e Marie (*in memorian*), meu respeito e gratidão pela dedicação, esforços e exemplos que contribuíram para minha formação moral e intelectual.

Ao meu esposo Guilherme, luz do meu caminho, pelo apoio incondicional e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Maurício Simões Abrão, pela oportunidade de cursar a pós-graduação sob sua orientação, pelo enorme aprendizado, exemplo de rigor acadêmico e estímulo ao desenvolvimento da ciência voltada à pesquisa clínica.

Ao Professor Doutor Sérgio Podgaec, a quem devo inúmeros ensinamentos e o incentivo ao meu ingresso no mestrado.

Ao Professor Doutor Jorge Kalil, pelo exemplo de compromisso com a qualidade da ciência, a saúde pública e pelas discussões científicas que tanto contribuíram para este trabalho.

À Mestra Maria Lucia Carnevale Marin, pelo aprendizado técnico e inestimável apoio acadêmico e moral, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Verônica Coelho, por aprimorar meu olhar e rigor sobre o “pensar científico”.

À Dra. Kátia Pincerato, pelo empenho na avaliação histológica das amostras.

À Dra Ana Cláudia Carreira, pelas orientações técnicas e direcionamento na execução experimental.

À Dra Marta Privato, aos médicos, Lidia Myung, Luciano Gibran, Igor Padovesi, Patrick Bellelis, Tatiana Yamashiro, Giuliano Borrelli e aos demais membros do setor de endometriose, pelo apoio incondicional e incentivo.

À Dra Luiza Guilherme e a todos os professores, alunos e colaboradores do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular- Laboratório de Investigação Médica 19 (LIM-19) e do Laboratório de Biologia Vascular do InCor, pelo acolhimento, apoio técnico e incentivo durante os anos de realização deste trabalho.

RESUMO

Rached MR. **Papel do HLA-G na endometriose** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, estrógeno-dependente e de etiologia multifatorial, caracterizada pela implantação e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina e associada à dor pélvica e infertilidade. A doença é classificada de acordo com os estádios e sítios de acometimento nos órgãos pélvicos. Variantes genéticas, endócrinas e ambientais podem contribuir para a geração de uma deficiência na resposta imune local permitindo a implantação das células ectópicas na cavidade pélvica. Alterações constatadas no padrão de citocinas presentes no microambiente pélvico poderiam promover um ambiente imunossupressor, justificando a diminuição da resposta imune efetora verificada na endometriose. Dentre os possíveis fatores imunomoduladores, está o antígeno leucocitário humano-G (HLA-G), cuja expressão se dá intensamente nas células trofoblásticas, sendo reconhecido por induzir a tolerância materno-fetal. A proteína HLA-G pode ser expressa na membrana celular ou ser secretada na forma solúvel. HLA-G encontra receptores inibitórios nas células do sistema imune inato e adaptativo e tem sua expressão induzida sob condições não fisiológicas, como em transplantes alogênicos, doenças inflamatórias ou neoplasias malignas. Assim, a hipótese deste estudo é a de que a proteína HLA-G seria produzida em níveis superiores nas mulheres com endometriose, o que poderia contribuir para a imunossupressão no microambiente da doença. Para testar esta hipótese, a proteína solúvel foi mensurada no soro e no fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Além disto, a expressão gênica de HLA-G foi avaliada nos tecidos de endométrio, por qRT-PCR, bem como a expressão da proteína, avaliada por imunohistoquímica, nos tecidos de endométrio e de lesão de endometriose, em mulheres com e sem a doença. Como resultados, verificaram-se maiores níveis da proteína solúvel no soro de mulheres que

apresentavam endometriose em estádios avançados, especialmente naquelas com endometriose ovariana. Entretanto, na comparação entre os fluidos peritoneais, não houve diferença significativa entre os grupos com e sem endometriose. A expressão do transcrito gênico (mRNA) se mostrou maior no endométrio de mulheres sem a doença, mas a presença da proteína foi semelhante entre os endométrios de mulheres com e sem endometriose. Por outro lado, a expressão da proteína HLA-G nos tecidos de lesão de endometriose avançada se mostrou superior à do endométrio de mulheres sem a doença, indicando que a expressão de HLA-G seria induzida ectopicamente, no microambiente pélvico da doença. Portanto, os resultados apontam para um aumento da expressão de HLA-G em endometriose avançada.

Descritores: antígenos HLA-G; endometriose; imunomodulação; imunossupressão; tolerância imunológica.

SUMMARY

Rached MR. **Role of HLA-G in endometriosis** [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Endometriosis is a chronic inflammatory, estrogen-dependent disease of multifactorial etiology characterized by implantation and growth of endometrial tissue outside the uterine cavity, and associated with pelvic pain and infertility. Endometriosis is classified according to the stages and sites of the disease. Genetic, endocrine and environmental factors may contribute to the deficit on local immune response, allowing ectopic implantation of endometrial cells into the pelvic cavity. Changes in cytokines pattern in the pelvic microenvironment might promote an immune suppressor environment and explain the decreased immune effector cells response verified in endometriosis. Among possible immunomodulatory factors is the human leucocytary antigen-G (HLA-G) which is intensively expressed in trophoblasts and recognized by inducing maternal-fetal tolerance. HLA-G protein is expressed in both membrane-bound and soluble forms. HLA-G binds inhibitory receptors on innate and adaptive immune cells surface and its expression is induced in non-physiological conditions, such as allogeneic transplants, inflammatory diseases or neoplastic malignancies. Thus, this study hypothesizes that the HLA-G protein would be overexpressed in women with endometriosis, and could contribute to the immunosuppression in the disease microenvironment. To test this hypothesis soluble HLA-G protein was measured in serum and peritoneal fluid of women with and without endometriosis. Moreover, HLA-G gene expression were evaluated on endometrial tissue using RT-qPCR, and HLA-G protein expression were evaluated in matched ectopic and eutopic endometrium of women with and without endometriosis. As results, higher levels of soluble HLA-G were found in serum of women with advanced endometriosis, especially in those with ovarian endometriosis. However, soluble HLA-G levels in peritoneal fluid did not show significant differences between women with and without endometriosis. HLA-G mRNA expression were higher in eutopic endometrium of women without

endometriosis, but the HLA-G protein expression were similar in eutopic endometrium of women with and without endometriosis. On the other hand, HLA-G protein expression in ectopic endometrium of women with advanced endometriosis was higher than in eutopic endometrium of women without endometriosis, suggesting that HLA-G expression was induced ectopically, in the pelvic microenvironment of the disease. In conclusion, the results point to an upregulation of HLA-G expression in advanced endometriosis.

Descriptors: HLA-G; endometriosis; immunomodulation; immunosuppression; immune tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via NFkB na endometriose.	7
Figura 2	Gene e isoformas protéicas do antígeno leucocitário humano-G (HLA-G).	16
Figura 3	Desenho do estudo.	40
Figura 4	Região gênica de amplificação do HLA-G, desenhos e características físico-químicas dos pares de primers mHLA-G e β -actina.	50
Figura 5	Cálculo da Eficiência dos primers HLA-G e β -actina.	51
Figura 6	Concentrações de sHLA-G (U/ml) no soro e fluido peritoneal de mulheres com e sem endometriose.	61
Figura 7	Concentrações de sHLA-G (U/ml) de acordo com estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da endometriose.	63
Figura 8	Concentrações de sHLA-G (U/ml) de acordo com os tipos de endometriose.	64
Figura 9	Expressão gênica de HLA-G no endométrio de mulheres com e sem endometriose.	67
Figura 10	Exemplos representativos das marcações imunohistoquímicas da proteína HLA-G usando o anticorpo monoclonal 4H84 em tecidos de endométrio e em lesões de endometriose.	70
Figura 11	Score de imunoreatividade (IRS) Final na avaliação imunohistoquímica da proteína HLA-G de acordo com as fases do ciclo menstrual.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critério de avaliação da marcação imunohistoquímica de HLA-G no epitélio glandular e no estroma de secções de tecidos de endométrio e de lesão de endometriose.	58
Tabela 2	Comparativos entre as concentrações de sHLA-G (U/ml) nos soros e nos fluidos peritoneais dos grupos Endometriose e Controle.	61
Tabela 3	Comparativos entre as concentrações de sHLA-G (U/ml) nos grupos Controle e Endometriose, de acordo com a fase do ciclo menstrual.	62
Tabela 4	Distribuição das lesões de endometriose segundo sua localização na pelve e de acordo com os estádios iniciais (I/II) ou avançados (III/VI) da doença.	65
Tabela 5	Avaliação estatística dos scores de imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no epitélio glandular e estroma dos endométrios do grupo Controle.	69
Tabela 6	Avaliação estatística dos scores de imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no epitélio glandular e estroma dos endométrios tópicos e lesões do grupo Endometriose.	69
Tabela 7	Score de Imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no endométrio e nas lesões de endometriose de acordo com os estádios da endometriose.	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma/leukemia-2</i>
bp	pares de bases
cDNA	DNA complementar
COX-2	Ciclooxygenase–2
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CTRL	Controle
DAB	Diaminobenzidina
DC	Célula dendrítica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxi-ribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo(s) trifosfatado(s)
DP	Desvio padrão
EDT	Endometriose
EOMA	Endometrioma
ER-β	Receptores beta-estrogênicos
FP	Fluido Peritoneal
g	Unidade de força gravitacional
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano- G
HPR	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i>
HSE	<i>Heat shock element</i>
HSF-1	<i>Heat shock factor-1</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IκB	Inibidor do fator nuclear NFκB
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4

IL-10	Interleucina-10
IMGT/HLA	<i>ImMunoGeneTics/ Human Leucocytary Antigens</i>
IRF-1	<i>IFN response factor-1</i>
IRS	Score de imunorreatividade
ISRE	<i>Interferon-stimulated regulatory element</i>
MEC	Matriz extracelular
mHLA-G	HLA-G de membrana
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIF	<i>Macrophage-migration inhibitory factor</i>
mg	Miligrama
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases de Matriz extracelular
mRNA	RNA mensageiro
n	Número amostral
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFkB	Fator Nuclear kappa B
NK	Células Natural Killer
ng	Nanograma
nm	Nanômetro(s)
nM	Nanomolar
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFD	Endometriose Profunda
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PR	Receptor de Progesterona
PRE	<i>Progesterone response element</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time- PCR</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RO	Radicais de oxigênio

rpm	Unidade de rotações por minuto
NRS	Retossigmóide normal
sHLA-G	HLA-G solúvel
SPF	Endometriose Superficial
T	Linfócitos Timocitários
Th1	Linfócito T <i>helper</i> -1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> -2
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	<i>Tool-like receptors</i>
Tris-HCL	Tris-hidroximetil-aminometano em ácido clorídrico
U/ml	Unidades/ Mililitro
VEGF	<i>Vascular endothelial grow factor</i>
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Endometriose	2
1.2	Etiopatogenia da endometriose	3
1.3	Sistema imune na endometriose	5
1.3.1	Imunovigilância e implantação da endometriose	9
1.3.2	HLA-G no contexto do MHC humano	13
1.3.3	HLA-G nas interações com o sistema imune	18
1.3.4	HLA-G na endometriose	23
2	JUSTIFICATIVA	27
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo geral.....	32
4.2	Objetivos específicos	32
5	MÉTODOS.....	33
5.1	Casuística	34
5.2	Delineamento do estudo	36
5.2.1	Pacientes: natureza dos grupos amostrais e critérios de inclusão	36
5.2.2	Dados clínicos: Fontes.....	37
5.2.3	Amostras: Natureza, coleta e preservação	37
5.2.4	Desenho do estudo	39
5.3	Técnicas analíticas	41
5.3.1	Deteção da proteína HLA-G solúvel por ELISA	41
5.3.2	Deteção do transcrito gênico de HLA-G por qRT-PCR	43
5.3.2.1	Lise de tecidos, extração e análise da integridade do RNA total.....	43
5.3.2.2	Síntese de cDNA	46
5.3.2.3	PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	47

5.3.3	Detecção da proteína HLA-G por imunohistoquímica.....	53
5.4	Análise estatística.....	58
6	RESULTADOS	59
6.1	Expressão da proteína HLA-G solúvel no soro e no fluido peritoneal...	60
6.2	Expressão do mRNA HLA-G no endométrio.....	66
6.3	Expressão da proteína HLA-G no endométrio e na endometriose	67
7	DISCUSSÃO	74
8	CONCLUSÃO.....	87
9	ANEXOS.....	89
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOMETRIOSE

A Endometriose (EDT) é uma doença inflamatória crônica, de etiologia multifatorial, caracterizada pela implantação e crescimento de tecido endometrial, contendo células glandulares e estromais, fora da cavidade uterina. A doença acomete principalmente os órgãos pélvicos (peritônio, ovários, ligamentos útero-sacros, saco de Douglas e septo reto-vaginal) e mais raramente o pericárdio, pleura e cérebro (Giudice e Kao, 2004). Trata-se de uma desordem estrógeno dependente, atingindo cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva, sendo associada à dor pélvica, dismenorréia, dispareunia e infertilidade, especialmente nos casos de EDT severa, devido à extensa adesão e distorção na anatomia da pelve (Khan KN et al., 2008a; Zanatta et al., 2010). Segundo Nisolle e Donnez (1997), a EDT pode ser classificada em três entidades diferentes: EDT peritoneal, ovariana (endometrioma) e EDT do septo reto-vaginal, mais recentemente caracterizada como EDT profunda (Kamergorodsky et al, 2009). A forma mais agressiva da doença corresponde à EDT profunda, caracterizada por infiltrações com profundidade superior a cinco milímetros na região retrocervical, podendo envolver a parede posterior da vagina, o retossigmóide, ureteres ou a camada muscular da bexiga (Abrão et al., 2003). Segundo a classificação *da American Society for Reproductive Medicine (ASRM)*, de 1996, a doença pode ser classificada em estádios de I a IV, de acordo com o número, tamanho e localização dos implantes endometrióticos, endometriomas e/ou adesões, sendo os estádios I e II considerados iniciais, III, intermediário e IV, EDT severa (Revised ASRM classification of endometriosis: 1996. Fertil Steril, 1997). Uma

vez que ainda não existe cura definitiva para a doença, o tratamento clínico é direcionado ao alívio dos sintomas e à supressão da atividade ovariana.

1.2 ETIOPATOGENIA DA ENDOMETRIOSE

Diversas são as hipóteses que tentam elucidar a etiopatogenia da EDT, mas nenhuma delas, se considerada individualmente, consegue explicar as diferentes formas e sítios anatômicos de manifestação da doença. Por outro lado, tomadas em conjunto, as hipóteses indicam que a etiologia da EDT é multifatorial, envolvendo fatores anatômicos, hormonais, genéticos, ambientais e os relacionados ao sistema imune. Dentre os diversos fatores imunológicos passíveis de envolvimento na etiopatogenia da EDT, estaria a proteína HLA-G, uma vez que esta exerce papel supressor sobre diferentes tipos celulares do sistema imune.

Dentre as hipóteses etiológicas da EDT, é amplamente aceita a hipótese da implantação via menstruação retrógrada, segundo a qual o tecido endometrial refluiria através das tubas de Falópio, recaindo sobre a cavidade pélvica (Sampson, 1927). Distorções anatômicas (Sanfilippo et al., 1986; Barbieri, 1998; Nawroth et al., 2006) e o maior volume de menstruação retrógrada, observado nas mulheres com EDT (Halme et al., 1984), favoreceriam o aparecimento da doença. Entretanto, esta teoria isolada não explicaria todos os casos adequadamente, uma vez que a menstruação retrógrada foi observada em cerca de 90% das mulheres com tubas funcionais submetidas à laparoscopia, sendo que apenas 8% delas chegaram a apresentar a doença (Halme et al., 1984; Liu e Hitchcock, 1986), sugerindo que

outros fatores devem determinar a susceptibilidade ao desenvolvimento da EDT.

Deste modo, outras hipóteses têm sido consideradas, tais como as hipóteses da metaplasia celômica (Meyer, 1919), ativação de restos embriogênicos (Longo, 1979), disseminação linfática ou vascular (Javert, 1952) e mais recentemente a hipótese da implantação de células progenitoras advindas da camada basal do endométrio (Leyendecker et al., 2002). Esta última sugere que parte das células epiteliais e estromais da camada basal descariam junto com as células da camada funcional nas mulheres com endometriose; a resistência à apoptose e a elevada capacidade proliferativa, intrínsecas destas células, favoreceriam sua sobrevivência em ambiente ectópico. Todas essas hipóteses, embora plausíveis, explicariam apenas o aparecimento das células endometriais nas regiões ectópicas, mas não elucidam os mecanismos subseqüentes, que permitiriam às células sobreviver às defesas do organismo de modo a estabelecer-se a lesão de EDT. Neste sentido, a hipótese imunológica, que admite uma deficiência na imunovigilância ou a supressão das células imunes, vem complementar às demais, uma vez que considera que mulheres que desenvolvem EDT possuem um sistema imune ineficiente, incapaz de reconhecer ou montar uma resposta eficaz para eliminar os fragmentos endometriais da pelve; ao mesmo tempo, admite que o sítio da lesão ou os fragmentos endometriais *per si* possuam diferenças genéticas ou ambientalmente adquiridas que permitam às células endometrióticas escaparem à eliminação pelo sistema imune (Ahn et al., 2015).

Assim sendo, a EDT pode ser considerada uma doença multifatorial, onde, além do excessivo volume de menstruação retrógrada, variantes

genéticas e endócrinas podem contribuir para a geração de um déficit na imunovigilância na cavidade peritoneal, possivelmente favorecido pela exposição a fatores ambientais incomuns, presentes nas mulheres susceptíveis à doença (Herington et al., 2011).

1.3 SISTEMA IMUNE NA ENDOMETRIOSE

Estudos têm demonstrado que o endométrio típico de mulheres com EDT mostra diferenças significativas em relação ao endométrio de mulheres sem a doença. Especificamente, o endométrio das mulheres com EDT apresenta maior resistência à eliminação por células do sistema imune (Braun et al. 1998; Dmowski et al., 1998), resistência à apoptose (Dmowski et al., 1998; Gebel et al., 1998), maior capacidade proliferativa (Wingfield et al., 1995) e maior produção de estrogênios (Bulun et al., 2006). Por outro lado, células do fluido peritoneal (FP) de mulheres com EDT apresentam citotoxicidade diminuída em relação às do FP de mulheres sem a doença (Oosterlynck et al., 1994). Tais diferenças podem ser resultado de alterações genéticas herdadas ou induzidas pelo ambiente (Moen e Magnus, 1993; Afshar et al., 2013).

Na EDT parece existir uma perda do padrão normal de sinalização endócrina e imune (Tariverdian et al., 2007). A este respeito, a resistência à progesterona foi caracterizada na doença. A expressão de genes dependentes da progesterona parece estar alterada no endométrio das mulheres com endometriose (Kao et al., 2003; Al-Sabbagh et al., 2012). Nos tecidos de lesões de EDT foram identificadas a ausência da expressão dos receptores de progesterona PR-B, a elevada expressão do receptor estrogênico ER- β e a

extraordinária expressão da enzima aromatase (Attia et al., 2000; Bulun et al., 2009; Bulun et al., 2010). A enzima aromatase, catalisadora da síntese de estradiol, foi identificada também no endométrio das mulheres com EDT (Noble et al., 1996). Por outro lado, a enzima 17beta-hidroxí-esteróide-desidrogenase-2, que converte estradiol à estrona (forma menos ativa), não foi encontrada nas células endometriais ectópicas (Zeitoun et al, 1998). Em última instância, tal fenótipo resultaria na predominância da ação do estradiol sobre as células endometriais em ambiente ectópico.

Existem evidências sugestivas de que a progesterona favorece a inibição do sistema imune. Por exemplo, a inflamação notada regularmente no endométrio, quando da queda dos níveis do hormônio precedente à menstruação. Neste período, a baixa atividade da progesterona sobre as células endometriais (epiteliais e estromais) resulta na quebra da proteção contra o estresse oxidativo, levando ao aumento da formação de radicais de oxigênio (RO); estes, por sua vez, ativam a via NF-kB, que induz diversas vias de transcrição de fatores esteroideogênicos e pró-inflamatórios, tais como a via da ciclooxigenase-2/prostaglandina (COX2/PG) (Evans e Salamonsen, 2012). De forma análoga, nas células endometrióticas, a resistência à progesterona favoreceria a formação de RO na cavidade. Outro fator favorável à geração de RO e de fatores pró-inflamatórios na pelve seria o excesso de hemácias despejadas mensalmente na cavidade peritoneal (via menstruação retrógrada). Tal fenômeno geraria um excesso de ferro (Fe) na pelve e no interior dos macrófagos residentes na cavidade, prejudicando a função fagocitária destes. Além disto, o excesso de Fe gera o aumento de RO e, conseqüente, a ativação da via NF-kB (González-Ramos et al., 2010) (Figura 1).

Fonte: Adaptada de González-Ramos et al. (2010).

Figura 1. Via NF-KB na endometriose. Macrófagos ativados secretam citocinas, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), que ativam a via NF-kB nas células endometrióticas (EcCs), amplificando a resposta inflamatória no local da lesão. O excesso de hemácias despejadas na cavidade peritoneal (via menstruação retrógrada) gera um excesso de ferro (Fe) na cavidade peritoneal e no interior dos macrófagos, o que prejudica a função fagocitária destes e também gera estresse oxidativo, ativando a via NF-kB. O Fe poderia, eventualmente, ativar a via NF-kB nas EcCs e aumentar a síntese de mediadores pró-inflamatórios (COX-2, IL-1, MIF, TNF- α , RANTES), bem como aumentar a síntese de fatores antiapoptóticos (Bcl-2), fatores de adesão e invasão ao endotélio (ICAM-1) e fatores de angiogênese (VEGF). As expressões e secreções de ICAM-1 e RANTES induzidas nas EcCs poderiam, ainda, favorecer a atração de macrófagos ao local do implante da endometriose. COX-2, ciclooxygenase 2; MIF, fator inibidor da migração de macrófago; RANTES, *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*, variedade de quimiocina atraente de leucócitos; ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*, molécula de adesão intercelular; Bcl-2, *B cell lymphoma/leukemia-2*, proteína antiapoptótica; VEGF, vascular endothelial growth factor, fator de crescimento do endotélio vascular; p50/p65 são subunidades formadoras da proteína NF-kB, fator transcricional que se liga ao DNA; IκB α , inibidor de NF-kB.

A ativação da via NF-kB seria favorecida ainda, pelo excesso de endotoxinas despejadas na cavidade peritoneal via menstruação retrógrada. Sabe-se que a menstruação favorece a invasão transiente de bactérias e que

endotoxinas bacterianas estimulam macrófagos e células endometriais a produzir elevados níveis de PGE2. A PGE2, por sua vez, causa imunossupressão e, por isto, poderia promover o crescimento de células endometrióticas indiretamente, ou ainda, diretamente, estimulando a síntese local de aromatase (Khan KN et al., 2009).

Em resumo, a resistência à progesterona, a predominância de estradiol e o estresse oxidativo na região do implante endometriótico favoreceriam a indução da via COX2/PG, levando à síntese de quimiocinas atraentes de leucócitos, citocinas ativadoras de linfócitos e fagócitos, bem como a síntese de fatores imunorreguladores, como a PGE2. Como resultado, o ciclo de proliferação e apoptose se tornaria rompido nas células endometrióticas— em favor da sobrevivência, uma vez que elevadas concentrações de estradiol e de determinadas substâncias produzidas pela ativação da via NF-kB estimulariam a síntese de fatores antiapoptóticos, angiogênicos e imunossupressores no microambiente da endometriose (Tariverdian et al., 2007).

Portanto, admitindo-se a alteração no padrão de sinalização endócrino-imune na EDT, a produção de fatores pró-inflamatórios estaria aumentada no ambiente pélvico das doentes, o que levaria à ativação de células do sistema imune. Entretanto, apesar da ativação celular, o sistema não é capaz de eliminar os focos da doença. Deste modo, seria possível supor que fatores potencialmente imunossupressores, como a proteína HLA-G, poderiam estar envolvidos na falha da imunovigilância verificada na EDT.

1.3.1 Imunovigilância e implantação da endometriose

A imunovigilância na cavidade peritoneal é representada por células imunes residentes e migratórias que efetuam a eliminação dos fragmentos de endométrio sem causar uma resposta inflamatória significativa (Bruner-Tran et al., 2013). Na maioria das mulheres, em seguida ao refluxo menstrual, os *debris* celulares e células endometriais apoptóticas são eliminados provavelmente por macrófagos residentes na pelve, uma vez que estes predominam dentre as células imunes regularmente identificadas no fluido peritoneal (Braun et al., 1998). Entretanto, nas mulheres com EDT, o que se verifica é uma inflamação crônica na pelve, onde além dos macrófagos, outras células imunes participariam dessa tentativa de “limpeza”, tais como fagócitos recrutados da circulação (neutrófilos e monócitos), células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos (CTL) (Ahn et al., 2015).

Em mulheres com EDT, estudos têm mostrado que a imunovigilância, aparentemente, não responde de maneira adequada à presença das células endometriais translocadas para a cavidade peritoneal (Christodoulakos et al., 2007). A este respeito, foram observados o decréscimo na citotoxicidade de células NK peritoneais (Oosterlynck et.al, 1992) associado à atividade imunossupressora do FP de mulheres com endometriose (Oosterlynck et.al, 1993). Também se verificou o aumento na ativação de monócitos e macrófagos peritoneais, mas com diminuição da capacidade fagocitária (Braun et al., 1998; Raiter-Tenenbaum et al., 1998)– provavelmente devida à inibição da expressão do receptor fagocitário CD36 (Chuang et al., 2010). Além disto, observou-se uma diminuição na atividade de MMP-9 e em sua produção por macrófagos do

FP em mulheres com EDT (Wu MH et al., 2005), fenômeno este que, assim como a inibição da expressão de CD36, se deu devido à ação da PGE2, presente no FP de mulheres com EDT em níveis muito superiores aos encontrados no FP de mulheres sem a doença (Wu MH et al., 2005). Outras alterações verificadas no FP de mulheres com endometriose, referem-se à diminuição do estado de ativação de linfócitos T CD4 e T CD8 (Oosterlynck et al., 1994; Ho et al., 1995; Gallinelli et al., 2004), bem como da citotoxicidade de linfócitos T CD8 (Steele et al., 1984; Oosterlynck et al., 1994).

Ainda não estão elucidados quais seriam os “sinais” que as células endometriais despejadas na cavidade pélvica enviariam ao sistema imune e que permitiriam a sua subsequente implantação, no caso de mulheres com EDT. Porém, sabe-se que as células responsáveis pelo processo de “limpeza” devem estar bem reguladas, para eliminarem apenas as células endometriais ectópicas, poupando as células uterinas (Osuga et al., 2011). Neste sentido, os linfócitos T reguladores (Tregs) desempenhariam um papel fundamental, através da produção de citocinas inibitórias que regulariam o nível de ativação das células imunes e controlariam a inflamação.

Berbic et al. (2010) verificaram que a quantidade de células Tregs (CD4 CD25 Foxp3) no endométrio de mulheres sem EDT sofria uma queda significativa na fase secretora, enquanto que em mulheres com EDT não houve significativa diminuição entre as fases proliferativa e secretora. Além disto, observaram que no tecido endometriótico a quantidade de Tregs praticamente se mantinha constante ao longo do ciclo menstrual. Tais achados sugerem que a maior expressão de células Tregs no endométrio de mulheres com EDT, durante a fase secretora tardia, diminuiria o recrutamento das células imunes,

conferindo às células endometriais uma vantagem de sobrevivência ao ataque imune e, conseqüentemente, de implantação em sítio ectópico por ocasião da menstruação retrógrada. Podgaec et al. (2012) por sua vez, compararam a concentração de Treg no fluido peritoneal de mulheres com e sem EDT e encontraram uma maior concentração das células no grupo doente, o que favoreceria a sobrevivência do implante ectópico.

De modo semelhante ao perfil da concentração de células Treg, o balanço entre os fatores pró e antiinflamatórias no FP também se mostra a favor da supressão da atividade imunológica nas mulheres com EDT (Podgaec et al., 2007). Segundo mencionado, a atividade de linfócitos T CD4 está diminuída no FP de mulheres com EDT, indicando que fatores presentes no FP suprimiriam a atividade das células T auxiliares (*T helper*), diminuindo a co-ativação de linfócitos e a indução de fagócitos. A este respeito, estudo avaliando a expressão de HLA em macrófagos do FP de mulheres com EDT mostrou que o fenótipo destes não favorecia a apresentação antigênica, uma vez que observaram um decréscimo na expressão de HLA-A, -B, -C e HLA-DR nos macrófagos peritoneais das doentes em relação às mulheres sem EDT (Kusume et al., 2005). Outro estudo, realizado por Lee et al. (2005), utilizando linhagem monocítica cultivada em meio contendo FP de mulheres com EDT, identificou uma diminuição na expressão de MHC classe II e das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86, indicando que substâncias presentes no FP endometriótico seriam capazes de afetar a apresentação antigênica e conseqüentemente diminuir a ativação de linfócitos T *helper*. Segundo o referido estudo, uma provável substância envolvida na diminuição da atividade

de *T helper* em EDT seria a interleucina IL-10, uma vez que a neutralização de IL-10, no meio de cultura, reverteu o efeito inibitório sobre os monócitos.

Alguns estudos mostraram que as produções de IL-4 e IL-10, por linfócitos periféricos e também por linfócitos do FP, estão aumentadas em mulheres com EDT (Hsu et al., 1997; Antsiferova et al., 2005). Observou-se, ainda, que a despeito do aumento na concentração de IFN- γ e IL-2, existe uma predominância de IL-4 e IL-10 no FP de mulheres com EDT profunda, refletindo um perfil Th2 (antiinflamatório) da resposta imune (Podgaec et al., 2010).

Com relação à diminuição da citotoxicidade de células NK em pacientes com EDT, alguns estudos indicam que tanto as NK periféricas quanto as peritoneais exibem menor citotoxicidade (Tanaka et al., 1992; Oosterlynck et al., 1992), sinalizando que o problema da funcionalidade de células NK não é quantitativo, mas sim qualitativo. Garzetti et al. (1993) observaram que existe significativa relação inversa entre a citotoxicidade de NK e os níveis séricos de hormônios em EDT. Nos estádios avançados da doença, a ineficiência das células NK se dava com o aumento de estrogênios e a diminuição da prolactina no sangue periférico, levando-os a propor que a interação endócrino-imune seria responsável pelo decréscimo da atividade de células NK na EDT.

Ainda a respeito da citotoxicidade de células NK, o endométrio tópico de mulheres com EDT parece ser mais resistente à lise mediada por estas células, em comparação ao endométrio de mulheres sem a doença (Oosterlynck et al., 1991). Além disto, a antigenicidade das células endometriais ectópicas parece estar alterada, apresentando uma superexpressão dos genes HLA classe I (Semino et al., 1995; Arimoto et al., 2003; Khan MA et al., 2012), o que as protegeria contra a citotoxicidade de células NK. Dentre os antígenos HLA

classe I passíveis de expressão alterada na EDT, poderia estar o HLA-G, antígeno imunossupressor, cuja expressão é induzida por citocinas reconhecidamente aumentadas na EDT, como a IL-10, por exemplo.

A falha na imunovigilância na EDT estaria relacionada, dentre outros fatores, à imunomodulação exercida pelas células endometriais em ambiente ectópico (Kyama et al., 2003). Embora a proteína HLA-G possua expressão constitutiva restrita às células trofoblásticas e a poucos tecidos, sua expressão em outros tipos celulares pode ser induzida sob condições inflamatórias, como na menstruação, período no qual a expressão de HLA-G foi detectada nas células endometriais (Kawashima et al., 2009). Portanto, seria possível supor que na EDT, HLA-G também pudesse exercer um papel na imunomodulação do ambiente peritoneal inflamado, onde a presença de citocinas específicas estimularia a sua expressão na superfície das células endometriais ectópicas e/ou nas células do sistema imune presentes no microambiente da doença.

1.3.2 HLA-G no contexto do MHC humano

O complexo principal de histocompatibilidade humano- MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*), também chamado de antígenos leucocitários humanos ou HLA (do inglês, *human leukocyte antigens*) está localizado no braço curto do cromossomo 6. O complexo gênico HLA codifica aproximadamente 132 proteínas importantes para a regulação do sistema imune e de outros processos celulares. Os genes mais bem descritos referem-se ao HLA classe Ia (HLA-A, -B, -C) e classe II, (HLA-DR, -DQ e -DP), todos eles altamente polimórficos e envolvidos na histocompatibilidade de órgãos

transplantados, na apresentação antigênica e também associados a doenças autoimunes. Entretanto, outra classe de genes HLA, denominada HLA Ib, ou não clássica, tem sido alvo de estudos devido sua relevância em processos biológicos, como a gestação, e na regulação do sistema imune em processos patológicos, como o desenvolvimento de tumores. Dentre os antígenos HLA classe Ib, HLA-E, -F e -G, ficou demonstrado que HLA-G pode exercer papel supressor sobre o sistema imune (Djurisic e Hviid, 2014).

Embora a estrutura molecular da proteína HLA-G seja a mesma das proteínas HLA de classe Ia— composta por uma cadeia alfa contendo três domínios e associada não covalentemente à β 2-microglobulina— diferentemente delas, sua principal função não é a apresentação de peptídeos antigênicos, devido ao baixo polimorfismo na região da fenda peptídica (Castelli et al., 2014a). As principais características que distinguem HLA-G das moléculas clássicas de classe I são: (a) limitada variedade de proteínas; (b) ocorrência de *splicing alternativo* do transcrito gênico primário, gerando diferentes isoformas de proteínas solúveis e de membrana; (c) curta porção citoplasmática da proteína; (d) indução de imunotolerância e (e) expressão restrita a poucos e específicos tecidos (Castelli et al., 2014a).

O gene HLA-G e proteínas codificadas

O gene HLA-G humano, segundo a sequência referência da base de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, NC_000006.12 (GRCh38), apresenta oito exons e sete introns, compatível com a estrutura dos genes clássicos de HLA classe I e compreende 4144 nucleotídeos entre as posições 29826979 e 29831122 no cromossomo 6p21.3. O transcrito primário

do gene HLA-G (mRNA) é capaz de produzir sete isoformas protéicas derivadas de *splicing* alternativo (Castelli *et al.*, 2014a). A estrutura do gene HLA-G, bem como dos derivados da recombinação alternativa, “*splicing*” do mRNA e as sete estruturas proteicas estão esquematizadas na Figura 2, segundo a nomenclatura da NCBI. A estrutura proteica derivada da tradução do mRNA integral, corresponde à isoforma HLA-G1, composta pela cadeia alfa (α)– que se posiciona externamente à membrana celular– e contém os três domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (exons 2, 3 e 4), além da região transmembrana (exon 5) e da porção citoplasmática (exons 6, 7 e 8) (Figura 2); $\alpha 1$ e $\alpha 2$ contribuem para a formação da fenda de ligação a peptídeos.

A isoforma completa, HLA-G1, encontra-se ancorada à membrana celular, associada à $\beta 2$ - microglobulina. Já as isoformas proteicas derivadas do *splicing* do mRNA, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4, podem se associar à membrana celular, porém não ligadas à $\beta 2$ -microglobulina. As isoformas HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7, por sua vez, são solúveis, podendo ser secretadas para o meio extracelular, sendo apenas HLA-G5 associada a $\beta 2$ microglobulina. HLA-G2 resulta da remoção do exon 3; HLA-G3, da remoção dos exons 3 e 4 e HLA-G4 resulta da retirada do exon 4 do mRNA inicialmente transcrito. HLA-G5 e 6 se tornam solúveis devido à permanência do intron 4 no transcrito primário, o que adiciona 21 aminoácidos na tradução das proteínas solúveis. HLA-G7, por sua vez, inclui o exon 2 e parte do intron 2 (Djurisic e Hviid, 2014) (Figura 2).

Fonte: Extraída de Hviid, 2006

Figura 2. Gene e isoformas protéicas do antígeno leucocitário humano-G (HLA-G). O gene HLA-G apresenta domínio citoplasmático mais curto que os demais genes HLA Ia e limitado polimorfismo na região codificante. A região 3'UTR e seu transcrito (mRNA) possuem um polimorfismo de inserção/deleção de 14 pares de bases (14 bp ins/del). Sete isoformas de mRNA e de proteínas são passíveis de geração por recombinação alternativa (*splicing*) do mRNA. Dentre as isoformas proteicas, três delas são solúveis (HLA-G5, -G6, -G7). Nelas ocorre a retenção de um códon de parada no intron 4 ou no intron 2. A isoforma de membrana comumente identificada é a HLA-G1, sendo provável a expressão na membrana também das isoformas mais curtas (HLA-G2, -G3, -G4). (Baseado em Hviid, 2006; Djuricic e Hviid, 2014 e Castelli *et al.*, 2014a).

Em contraste aos genes HLA classe I clássicos, o gene HLA-G apresenta baixíssima variabilidade em sua região codificadora. Até o momento, apenas cinquenta alelos foram reconhecidos, segundo o banco de dados ImMunoGeneTics- IMGT/HLA. A maioria das variações de um único nucleotídeo (SNV, do inglês, *single nucleotide variations*) são mutações sinônimas ou variantes intrônicas, resultando em apenas dezesseis proteínas diferentes descritas até o momento (Castelli *et al.*, 2014a). Em contrapartida, o gene HLA-G apresenta polimorfismo mais significativo em regiões não

codificantes: introns, região promotora e região 3' não tradutora do mRNA (3'UTR).

A variação na região 3'UTR do gene HLA-G pode influenciar a estabilidade do mRNA ou a ligação a microRNAs, afetando, desta forma, a regulação gênica pós-transcricional. A variação mais estudada na região 3'UTR consiste no polimorfismo de deleção/inserção de 14 pares de bases (14 bp-del/ins) e está associado a doenças autoimunes, como artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (Brenol et al., 2012), bem como a pré-eclâmpsia e abortos espontâneos recorrentes (Shankarkumar et al., 2011; Djurisic e Hviid, 2014). O polimorfismo 14 bp-del/ins está localizado na posição +2960 do exon 8 (Figura 2), sendo que a inserção de 14 bp resulta em níveis reduzidos de mRNA. Tal fato ocorre porque a presença dos 14 bp induz a um passo adicional de *splicing* alternativo no mRNA, levando à remoção de 92 nucleotídeos, que resulta em maior instabilidade do mRNA (Brenol et al., 2012).

A região promotora do gene HLA-G, por sua vez, apresenta vários sítios de polimorfismo junto às sequências de nucleotídeos que servem como elementos reguladores. A variação de nucleotídeos na região promotora pode influenciar os níveis de HLA-G, uma vez que modifica as afinidades de ligações a fatores de transcrição. Diferentemente dos genes HLA classe Ia, a região promotora do gene HLA-G não apresenta funcionalidade nos mesmos sítios conservados dos elementos responsivos a IFN- γ (*interferon-stimulated regulatory element* - ISRE) ou NF- κ B (*Enhancer A element*). Por outro lado, foram identificados elementos responsivos a progesterona (PRE), proteína de choque térmico, Hsp (HSE) e hipóxia (HRE) na região promotora de HLA-G (Castelli et al., 2014a). Embora a expressão de HLA-G seja induzida por IL-10

(Moreau et al., 1999; Rizzo et al., 2005) e glicocorticóides (Moreau et al., 2001), não foram identificados, no gene, os elementos responsivos correspondentes (Castelli et al., 2014b).

1.3.3 HLA-G nas interações com o sistema imune

A proteína HLA-G e seu papel imunomodulador foram primeiramente identificados nas células *extravillous* trofoblásticas (EVT) na interface com o útero, onde a proteína secretada ou fixa à membrana das células EVT interage com os receptores inibitórios na superfície de células NK uterinas (uNK), contribuindo para a manutenção da tolerância materno-fetal (Carosella et al., 2003). Posteriormente, a expressão de HLA-G foi observada sob condições fisiológicas na córnea, timo, ilhotas pancreáticas e em precursores eritróides e endoteliais (Brenol et al., 2012).

Entretanto a expressão de HLA-G em outros tipos celulares pode ser induzida sob condições patológicas ou em transplantes, conforme observado em aloenxertos e células mononucleares infiltradas nos tecidos enxertados (Rouas-Freiss et al., 2003) e em células apresentadoras de antígenos (APC) infiltradas nos tecidos lesionados por infecções virais, doenças inflamatórias ou autoimunes (Lozano et al., 2002; Pangault et al., 2002; Brenol et al., 2012).

A proteína HLA-G também foi identificada em doenças linfoproliferativas, em tumores sólidos de diversas naturezas, bem como nas células APC infiltradas nos tumores (Gros et al., 2006; Kleinberg et al., 2006; Menier et al., 2009). Além disto, a indução *in vitro* da expressão gênica e protéica de HLA-G foi observada em monócitos do sangue periférico e linhagens de células

tumorais, estimulados por IFN β , IFN γ e IL-10 (Yang Y et al., 1996; Moreau et al., 1999; Lefebvre et al., 2001).

A atividade imunomoduladora de HLA-G pode dar-se de duas formas—através da ligação direta a receptores específicos ou pela indução da expressão destes em células do sistema imune, a saber: células NK, células dendríticas (DC), monócitos, macrófagos, linfócitos TCD8, TCD4 e linfócitos B.

Os receptores com afinidade pela proteína HLA-G são: LILRB1(ILT2/CD85j)¹, expresso por todos os monócitos, macrófagos, DC, linfócitos B e algumas linhagens de linfócitos T e células NK; LILRB2 (ILT4/CD85d), expresso somente por monócitos, macrófagos e DC; KIR2DL4(CD158d), estritamente expresso por células NK (Carosella et al., 2008).

O receptor KIR2DL4 (*killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4*) possui características estruturais comuns tanto a receptores inibitórios, como a ativadores. KIR2DL4 possui a terminação ITIM² no citoplasma, característica de receptor inibitório e, ao mesmo tempo, apresenta um aminoácido carregado positivamente, na região transmembrana, típico de receptores KIR ativadores (Rajagopalan e Long, 2005). Segundo verificaram Rajagopalan e colaboradores (2001), KIR2DL4 é um receptor ativador, com a propriedade

¹ LILRB, do inglês *Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptor-B*, receptor da superfamília das imunoglobulinas, previamente denominado ILT- *Immunoglobulin Like Transcript* ou CD85, *cluster of differentiation 85*.

² ITIM, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, são resíduos de tirosina que exercem inibição, presentes nas terminações de receptores de células imunes. Receptores com cauda citoplasmática longa carregam uma ou duas terminações. Receptores com cauda citoplasmática curta têm um resíduo de lisina na porção transmembrana, o qual é requerido para parear com a proteína adaptadora DAP12 citoplasmática, que possui terminação ativadora ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*).

única de induzir a produção de IFN- γ , mas não a citotoxicidade em células NK em repouso.

Com relação aos receptores LILRB, a ligação a HLA-G depende da estrutura da isoforma protéica em questão, sendo a presença da β 2-microglobulina essencial para a ligação de HLA-G ao receptor LILRB1, mas não essencial para a ligação a LILRB2 (Carosella et al., 2008). Segundo a estrutura cristalográfica da proteína HLA-G, o possível sítio de ligação a LILRB1 e LILRB2 fica no domínio α 3, que é estruturalmente diferente do α 3 das moléculas clássicas de MHC classe I (Clements et al., 2005). Mais ainda, dímeros de HLA-G têm mostrado afinidade de ligação cerca de cem vezes maior pelos receptores LILR do que os monômeros (Shiroishi et al., 2006). Peculiarmente, HLA-G possui dois resíduos de cisteína, na posição 42 do domínio α 1 e na posição 147 do domínio α 2, o que permite a dimerização pela formação de ponte dissulfeto (Boyson et al., 2002).

Além dos receptores mencionados, ficou demonstrado que o co-receptor CD8 é capaz de ligar-se à forma solúvel de HLA-G (sHLA-G), levando células T e NK à apoptose através da ativação da via Fas/FasL³ (Contini et al. 2003). A ligação de HLA-G solúvel ao receptor CD160 nas células endoteliais também mostrou induzir essas células à apoptose por mecanismos ainda não elucidados (Fons et al., 2006).

³ A via Fas/FasL trata-se da via apoptótica induzida pela ligação entre as proteínas Fas e FasL. Fas (CD95) é uma proteína de membrana pertencente à família das proteínas receptoras TNF/NGF (*tumor necrosis factor/nerve growth factor*). A proteína ligante a Fas (FasL) pertence à superfamília TNF.

Em células do sistema imune, a ligação do HLA-G aos receptores inibitórios induz a apoptose de células T CD8+ ativadas (Kapasi et al., 2000), modula a atividade de células NK (Rajagopalan e Long, 1999) e de células dendríticas (DC) (Liang et al., 2008). Em casos de transplantes de órgão ou tecidos, a interação HLA-G-receptor imune bloqueia a alo-citotoxicidade de linfócitos T, induz a expansão de populações de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) e de células T CD4 e CD8 supressoras (CD3+Foxp3-) (Naji et al., 2007; Selmani et al., 2008). A ligação do HLA-G ao receptor LILRB2 (ILT4) também evita a expressão de moléculas co-estimulatórias e inibe a maturação de DC (Ristich et al., 2007).

Há tempos se sabe que células APC, quando expressam muito HLA-G, são fracas estimuladoras e induzem células T CD4 supressoras e/ou anérgicas (LeMaoult et al., 2004). Células T supressoras (CD4+ ou CD8+) que expressavam HLA-G foram identificadas no sangue periférico e em tecidos inflamados (Feger et al., 2007). Além disto, células T CD4+ foram induzidas à diferenciação em células T reguladoras adaptativas tipo-1 (Treg-1, CD25+Foxp3+) por meio do contato com um subtipo específico de células dendríticas identificadas no sangue periférico, as chamadas DC-10, altamente produtoras de IL-10 e expressoras de HLA-G e receptores LILRB (ILT) (Gregori et al., 2009). Mais ainda, demonstrou-se que a IL-10 produzida pelas DC-10 induzia a expressão de HLA-G nas células TCD4+, e que a diferenciação em Treg-1 se devia à interação entre os dois tipos celulares via HLA-G/ILT4 (Gregori et al., 2011). A indução da expressão de HLA-G em células do sistema imune, seja por tumores, enxertos ou agentes patogênicos, está associada, portanto, à anergia ou imunossupressão.

Avaliações do sangue periférico de pacientes acometidos por doenças neoplásicas têm mostrado que o soro destes doentes possui uma concentração de HLA-G solúvel (sHLA-G) superior à encontrada em indivíduos saudáveis (Gros et al., 2006; Sebti et al., 2007; Schütt et al., 2010). Em pesquisa envolvendo pacientes com neuroblastoma observou-se, ainda, que as células preponderantemente secretoras de sHLA-G não foram as células tumorais, mas sim os monócitos periféricos ativados por citocinas derivadas do tumor. Além disto, sHLA-G do soro destes doentes foi capaz de inibir, *in vitro*, a citotoxicidade de linfócitos T citotóxicos (CTL) e de células NK contra linhagens de neuroblastoma (Morandi et al., 2007).

Estudos têm mostrado que a expressão de HLA-G é induzida também na membrana de células tumorais de diferentes naturezas. Como exemplos, a expressão anormal de HLA-G1 foi verificada em células de carcinoma pulmonar (Urosevic et al., 2001), câncer de mama (Lefebvre et al., 2002) e em adenocarcinoma endometrial (Barrier et al., 2006a).

Outros estudos demonstraram ser possível a clivagem de HLA-G1 por MMPs e sua liberação na forma solúvel (Zidi et al., 2006) ou a secreção direta da isoforma solúvel HLA-G5, identificada no plasma de pacientes com desordens linfoproliferativas (Sebti et al., 2007), câncer de pulmão (Schütt et al., 2010) e em efusões extraídas de carcinoma de ovário, onde dímeros de HLA-G5 foram observados (Zilberman et al., 2012).

Fatores ambientais comumente encontrados na placenta e em certos tumores são cruciais para indução, aumento ou manutenção da expressão de HLA-G verificada em alguns tipos celulares. Dentre os fatores já identificados estão as citocinas IL-10 (Moreau et al., 1999), IFN- β (Lefebvre et al., 2001),

IFN- γ (Yang Y et al., 1996), IL-10 associada a IL-2, IFN- γ e GM-CSF (Sebti et al., 2003), LIF⁴ (Bamberger et al., 2000), os hormônios glicocorticóides (dexametasona, hidrocortisona) (Moreau et al., 2001) e progesterona (Yie et al, 2006). Além destes, a proteína galectina-1⁵ (Tirado-González et al., 2013) e os fatores presentes sob condições de estresse, como hipóxia e a proteína Hsp (Ibrahim et al., 2000; Mouillot et al., 2006) também foram capazes de induzir a expressão de HLA-G. Estes fatores regulatórios exercem controle sob a quantidade do transcrito gênico e/ou da proteína HLA-G e alguns deles levam também à diminuição da expressão das moléculas HLA Ia– especificamente IL-10 (Moreau et al., 1999) e glicocorticóides (Moreau et al., 2001).

1.3.4 HLA-G na endometriose

Analogamente aos estudos em câncer, evidências recentes dão indícios de que o antígeno HLA-G possa estar envolvido na redução da atividade de células imunes na EDT. Especificamente, as células NK de mulheres com EDT expressam mais receptores KIR inibitórios do que KIR ativadores (Wu MY et al., 2000; Yang JH et al., 2004; Kitawaki et al., 2007). Além disto, observou-se que a frequência da combinação genotípica KIRs inibitórios/HLA-classe I

⁴ LIF, Fator Inibidor de Leucemia, do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*; trata-se de citocina expressa nos citotrofoblastos, principalmente durante o período denominado “janela de implantação”, e contribui para a implantação do embrião.

⁵ Galectina-1, proteína altamente conservada evolutivamente, com afinidade de ligação a resíduos glicanos em β -galactosídeos de membrana, envolvida na modulação das interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Considerada um fator de imunossupressão, uma vez que exerce ação autócrina negativa na proliferação de linfócitos T.

estava significativamente aumentada nas pacientes com EDT comparada à de mulheres sem a doença (Kitawaki et al., 2007).

Particularmente em relação à citotoxicidade de células NK, estudos *in vitro* demonstram que o nível de citólise diminui de acordo com o aumento da proporção de HLA-G1 expresso na superfície das células alvo (Rouas-Freiss et al., 2007; Chen BG et al. 2013). Paralelamente, observou-se que nos casos de mulheres com abortos espontâneos de repetição, a funcionalidade das células NK se mostrava excessivamente elevada (Somigliana et al., 1999, Aldrich et al., 2001), enquanto que na EDT estava reduzida (Oosterlynck et al., 1992), semelhantemente ao que ocorre nos casos de tumores (Vitale et al., 2014). No tocante às mulheres com abortos de repetição, existem indícios de que o polimorfismo de inserção de 14 bp na região 3'UTR do gene HLA-G poderia estar associado à menor expressão da proteína HLA-G nos citotrofoblastos (Shankarkumar et al., 2011) e, conseqüentemente, à maior atividade das células NK uterinas. Em contrapartida, a menor atividade de células NK na EDT poderia estar associada a uma maior expressão da proteína HLA-G nas células endometriais ectópicas.

A produção de citocinas de perfil Th2, passíveis de modulação por HLA-G, também foi investigada em EDT. Linfócitos expressores de IL-10 e IL-4 ocorreram em maior percentagem no sangue periférico de mulheres com endometriose (Antsiferova et al., 2005). O FP de mulheres com EDT, por sua vez, apresentou maior concentração das citocinas IFN γ , IL-10 e IL-4 do que o FP de mulheres sem a doença (Podgaec et al., 2007). Mais ainda, observou-se maior concentração de IL-12 no FP em EDT severa (Fairbanks et al., 2009), o que estimularia a produção de IL-4, 5, 10, e 13.

Recentemente, Kawashima et al. (2009) observaram que a proteína HLA-G estava expressa em quantidades semelhantes no endométrio típico de mulheres com e sem EDT, mas somente durante a fase menstrual, estando ausente sob condições não inflamatórias (fases secretora ou proliferativa). Além disto, identificaram a presença do receptor específico para HLA-G, KIR2DL4, em células NK do FP em mulheres com e sem EDT. Tais evidências levaram os pesquisadores a sugerir que células epiteliais carregando o antígeno HLA-G adentrem à cavidade peritoneal durante a menstruação retrógrada, permitindo que o antígeno reaja localmente com o receptor KIR2DL4 na superfície das células NK (Kawashima et al., 2009).

Outros achados relevantes em EDT referem-se à identificação de HLA-G no epitélio glandular de lesões endometrióticas no peritônio (Barrier et al., 2006b). A proteína HLA-G foi também identificada em adenomiose, tanto no epitélio glandular como no estroma, em células endometriais típicas e ectópicas (Wang et al., 2008).

A proteína HLA-G solúvel, por sua vez, foi investigada ora no FP, ora no soro de mulheres com EDT. Eidukaite e Tamousiunas (2008) avaliaram o FP de 58 mulheres com queixas de dores abdominais, subdivididas em grupos com EDT inicial (17, estágio I ou II), EDT avançada (14, estágio III ou IV) e sem EDT (27), mas não encontraram diferença entre os grupos. A avaliação no soro, por sua vez, realizada por Mach et al. (2010), comparou os níveis de HLA-G solúvel em 123 mulheres doentes subdivididas em 3 grupos– com endometrioma (30), com EDT profunda (28) e com cancer ovariano (65). Como resultados, observaram maiores concentrações de HLA-G no soro do grupo com EDT profunda comparado ao grupo com endometrioma, mas não quando

comparado ao grupo com câncer ovariano. Além disto, compararam as concentrações séricas de HLA-G subdividindo as mulheres em fase proliferativa e secretora do ciclo menstrual e observaram maior concentração na fase secretora apenas no grupo com EDT profunda.

Mais indícios da possível interferência de HLA-G na EDT vêm do aumento da expressão de FasL, tanto no endométrio tópico como no ectópico das doentes (Harada et al., 2004). Como mencionado, HLA-G via ligação a CD8 induz a via Fas/FasL. A proteína FasL expressa nas células ectópicas, poderia ser convertida à forma ativa solúvel por ação de MMPs e ligar-se ao receptor apoptótico Fas em linfócitos T que circulam próximos ao implante, induzindo-os à apoptose (Harada et al., 2007). Cabe salientar que a expressão de FasL foi induzida em células estromais endometrióticas por IL-8 (Selam et al., 2002) e CCL2 (Selam et al., 2006), sabidamente aumentadas no soro e fluido peritoneal de mulheres com EDT (Osuga et al., 2011).

Portanto, em EDT, os fenótipos das células endometriais e dos diferentes tipos celulares presentes no microambiente da lesão parecem induzir uma resposta imune anormal, no que se refere ao reconhecimento antigênico, nível de ativação e citotoxicidade que, em última instância, favoreceriam a sobrevivência do implante endometriótico.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a patogênese da endometriose ainda não está totalmente elucidada e que mecanismos imunossupressores parecem contribuir para o desenvolvimento da doença, a pesquisa da proteína imunomoduladora HLA-G se mostra relevante na endometriose.

Assim, considerando que em mulheres com endometriose, alterações endócrino-imunes e diferenças genéticas ou ambientalmente adquiridas predisporiam as células endometriais à sobrevivência fora do útero, a pesquisa simultânea da expressão de HLA-G no microambiente da doença, no sangue periférico e no endométrio, em comparação a mulheres livres de doenças inflamatórias, poderia auxiliar a elucidar a etiopatogenia da endometriose.

3. HIPÓTESE

Considerando-se o microambiente inflamatório da endometriose, onde determinados fatores seriam capazes de induzir a expressão de HLA-G e de seus receptores, a hipótese do estudo é a de que as células endometriais ectópicas expressariam níveis de HLA-G superiores aos eventualmente encontrados no endométrio típico de mulheres saudáveis e induziriam a supressão da resposta imune, a partir do aumento da expressão de HLA-G de membrana e/ou da secreção de HLA-G na forma solúvel.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da pesquisa foi verificar o possível envolvimento da proteína HLA-G na fisiopatologia da endometriose.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a concentração local e sistêmica de HLA-G solúvel em mulheres com e sem endometriose, de acordo com as fases do ciclo menstrual, localização e estágio da doença.

2. Avaliar a expressão gênica e protéica de HLA-G entre os endométrios de mulheres com e sem endometriose, bem como a expressão protéica nas lesões de endometriose profunda, considerando os estádios da doença.

5. MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo transversal, caso-controle, com a seguinte casuística:

- a) Grupo Endometriose (EDT), composto por mulheres diagnosticadas com endometriose (EDT), confirmada por cirurgia laparoscópica.
- b) Grupo Controle (CTRL), composto por mulheres sem EDT submetidas à laqueadura tubária laparoscópica, ocasião em que foi possível verificar-se a real ausência da doença.

Tratando-se da pesquisa do antígeno HLA-G solúvel, o número amostral (n) foi inicialmente definido em 112 pacientes, em ambos os grupos (EDT e CTRL). A definição do n para a variável contínua, “concentração de HLA-G solúvel (U/ml)”, foi baseada numa diferença entre caso e controle de pelo menos o dobro do valor na concentração sérica (Cao et al., 2011, Provatopoulou et al., 2012). Com base na literatura, o valor esperado de HLA-G solúvel no soro em pessoas saudáveis é de 10,1 U/ml, com variabilidade aproximada de 30,0 U/ml ($DP=30,0$ U/ml), segundo Jeong et al, 2014. Admitindo um poder de 80% e confiança de 95%, a amostra necessária seria de 112 mulheres em cada grupo (EDT e CTRL). Entretanto, uma vez atingido o número amostral de 132 no grupo EDT, mas de apenas 70 no grupo CTRL, novo cálculo amostral foi realizado, baseando-se nas médias das concentrações de HLA-G no soro de ambos os grupos. Foram obtidas as seguintes médias $\pm$ desvios padrões: controles ($8,60\pm 8,43$) e casos com endometriose ($16,78\pm 23,66$); notou-se que as variâncias foram diferentes

entre casos e controles, analisadas pelo teste de Levene ($p < 0,05$), ou seja, as amostras são heterocedásticas entre si. Para o cálculo do tamanho amostral considerou-se, portanto, a diferença entre as duas médias (8,18) e a variância estimada entre as duas amostras (337,45) para um risco $\alpha \leq 5\%$ para cometer erro tipo I e risco $\beta \leq 20\%$ para cometer erro tipo II. Estimando-se um poder amostral de 80%, o número necessário para o estudo seria de 168 mulheres. Devido à diferença entre as variâncias observadas, a distribuição das 168 mulheres se daria de forma heterogênea entre os grupos caso e controle. Tal distribuição se dá pela razão dos coeficientes de variação (CV) entre as duas amostras, que ficariam assim distribuídas: amostra de casos no grupo EDT (CV=141%) seria de 114 mulheres; amostra no grupo CTRL (CV=96%) seria de 54 mulheres. Sendo assim, os números amostrais alcançados em ambos os grupos superaram o n exigido no recálculo amostral e, portanto, foram considerados satisfatórios.

No caso das avaliações da expressão gênica e proteica de HLA-G nos tecidos, o n definido foi de 18 pacientes em cada grupo. O cálculo foi baseado em dados da literatura, segundo a estimativa de um nível de significância (α) de 0,05 e um poder do teste de 90%, considerando-se encontrar uma diferença (ϵ) entre caso e controle de 0,50, com variação (σ) de 0,50, baseado em Jung et al., 2009 e Kawashima et al., 2009.

Os cálculos de tamanho amostral foram realizados através do programa estatístico R (*R Development Core Team*, 2009).

5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

5.2.1 Pacientes: natureza dos grupos amostrais e critérios de inclusão

As pacientes incluídas no estudo pertenciam ao Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP e concederam prévia autorização, através da assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Anexos I.a e I.b), para a cessão de informações clínicas, bem como para a coleta dos materiais biológicos descritos no item a seguir. O estudo contou com a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (Anexo II), que foi devidamente registrada na Comissão de Pós-Graduação da Instituição.

Os critérios para a inclusão das mulheres, tanto no grupo EDT, como no CTRL foram: idade reprodutiva; ciclos menorréicos; abstinência de medicamentos hormonais por no mínimo três meses anteriores à data da cirurgia; comprovação da presença ou ausência da doença por observação cirúrgica laparoscópica. O critério para a não inclusão ou exclusão de mulheres em ambos os grupos foi a presença de evidências clínicas e laboratoriais (quando necessário) de outras doenças inflamatórias, tumores ou doenças autoimunes.

Para efeito de confirmação das condições clínicas estabelecidas para a inclusão/exclusão de pacientes, os laudos dos exames

anatomopatológicos das mulheres de ambos os grupos amostrais foram avaliados e excluídas aquelas que apresentaram doenças não diagnosticadas previamente à data da cirurgia. Sempre que possível, biópsias de endométrio coletadas durante as cirurgias tiveram a datação determinada por análise anatomopatológica, com o objetivo de determinar a fase do ciclo menstrual em que se encontrava a paciente à data da cirurgia.

5.2.2 Dados clínicos: Fontes

As informações referentes aos tipos de endometriose e estágio da doença foram obtidas a partir dos registros nos relatórios cirúrgicos, feitos em formulário específico (Anexo IV) e baseado no critério de classificação da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (1996) (Anexo V). Já a fase do ciclo menstrual, sempre que possível, foi considerada aquela datada por médico patologista, a partir da avaliação de biópsia do endométrio, e constante no laudo anatomopatológico. Nos casos em que a datação não foi realizada, foi considerada a data da última menstruação, informada pela paciente e registrada no relatório cirúrgico, para definição da fase do ciclo menstrual da paciente na data da realização da coleta das amostras.

5.2.3 Amostras: natureza, coleta e preservação

As amostras foram prospectivamente coletas ou selecionadas a partir do “Banco de Tecidos e Fluidos Corporais de Pacientes com Endometriose”,

projeto previamente desenvolvido pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia com o intuito de atender aos projetos de pesquisa que obedecessem aos mesmos critérios de inclusão/exclusão do presente estudo. O protocolo de pesquisa do referido projeto, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi aprovado na CAPPesq/ HCFMUSP, sob o nº0505/07 (Anexo III) e serviu de fonte de amostras de tecidos e fluidos corporais para os projetos de pesquisa incluídos no protocolo de pesquisa CAPPesq nº 0386/11, dentre os quais se inclui o presente projeto objeto de mestrado, conforme atestado pelo Anexo II.

Amostras de sange periférico e fluido peritoneal foram coletadas para a pesquisa da proteína HLA-G solúvel. Cerca de 5 ml de sangue periférico foram coletados em tubos contendo gel separador, preferencialmente antes da indução anestésica. Após a coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, por 10 minutos, para obtenção dos soros que seriam utilizados para a pesquisa. Os soros foram preservados a -80 °C até o momento de uso. As amostras de fluido peritoneal, por sua vez, foram coletadas no início da cirurgia laparoscópica, logo após as punções com os trocateres, através de aspiração em seringa estéril. As amostras foram processadas em centrífuga (1800 rpm por 10 minutos), para separação da fração celular, e a fração sobrenadante de interesse foi armazenada em tubos de congelamento estéreis, em freezer a - 80°C, até seu uso.

As amostras utilizadas na avaliação da expressão gênica e expressão protéica de HLA-G correspondem a biópsias (1 a 3 cm²) do tecido endometrial de ambos os grupos de mulheres e de tecidos excisados

contendo as lesões de endometriose, no caso do grupo doente. As coletas dos endométrios se deram através de cânula de aspiração de *Pipelle*, no início das cirurgias; as amostras das lesões de endometriose constituíram-se de produtos da ressecção de lesões de endometriose intestinal (retossigmóide) e lesões retrocervicais.

As amostras de tecido endometrial coletadas foram, em parte, transferidas imediatamente para criotubos e congeladas em nitrogênio líquido até serem transferidas para freezer -80 °C, onde permaneceram armazenadas até o momento da sua utilização para determinação da expressão gênica. Outra parte dos tecidos de endométrio, bem como os tecidos contendo as lesões de endometriose (retossigmóide ou retrocervical) destinaram-se à análise anatomopatológica regular, seguida da fixação com formalina e inclusão em parafina. Por ocasião dos ensaios para avaliação da proteína tecidual, os blocos de parafina selecionados foram submetidos à microtomia e lâminas de cortes histológicos foram confeccionadas. Os blocos de tecidos selecionados foram de duas naturezas– blocos contendo fragmentos de endométrio, nos casos dos grupos CTRL e EDT e blocos contendo fragmentos de endometriose retossigmóide ou retrocervical (grupo EDT).

5.2.4 Desenho do estudo

O estudo contempla três ramos de pesquisa, utilizando técnicas laboratoriais diferentes, a saber: Imunoensaio enzimático (ELISA), para a

pesquisa da proteína HLA-G solúvel; reação em cadeia com polimerase (PCR), quantitativa e em tempo real (qRT-PCR), para avaliação da expressão gênica de mRNA e imunohistoquímica, para detecção da proteína tecidual, segundo o desenho do estudo ilustrado na figura 3.

Cabe salientar que os números amostrais apresentados no desenho experimental para os ensaios de imunohistoquímica e qRT-PCR superam o *n* mínimo, descrito no item 5.1, uma vez que foi possível, ao longo do desenvolvimento do trabalho, prospectar e incluir, em ambos os grupos, um número maior de pacientes do que o definido.

Figura 3. Desenho do estudo. Descrição dos números amostrais (n), naturezas das amostras e metodologias aplicadas para a avaliação da expressão gênica e proteica de HLA-G na endometriose. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) foi específica para as isoformas de membrana do gene HLA-G (mHLA-G). CTRL, controle; EDT, endometriose; RS, retossigmóide; RC, retrocervical.

5.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.3.1 Detecção da proteína HLA-G solúvel por ELISA

A pesquisa de HLA-G solúvel (sHLA-G) foi realizada pela técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) indireto, utilizando-se o *Kit* RD194070100R sHLA-G ELISA (*Exbio*, República Tcheca). O Kit traz todos os reagentes necessários, incluindo um tubo com o antígeno humano sHLA-G liofilizado e uma microplaca de 96 poços sensibilizada com o anticorpo monoclonal de camundongo MEM-G 9 específico para a detecção dos antígenos solúveis HLA-G1 clivado (cHLA-G1) e HLA-G5. De acordo com a indicação de volume prescrita na bula do produto, o antígeno sHLA-G liofilizado foi reconstituído em água destilada, atingindo a concentração de 625 U/ml. A solução foi, em seguida, diluída em série para obtenção das concentrações necessárias à construção da curva de calibração, a saber: 125,00; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 (U/ml). O volume de 100 μ L de cada produto da série de diluições foi dispensado (em duplicata) nos poços da microplaca, assim como as amostras de soro e fluido peritoneal correspondentes a cada paciente. Como controle negativo (branco) foi usado o tampão de diluição (100 μ L, em duplicata). A microplaca foi então incubada a 37 °C durante 16 a 20 horas, após o quê os poços foram lavados com solução de PBS por 5 vezes e a eles adicionados um conjugado composto pelo anticorpo monoclonal anti- β 2 microglobulina humana marcado com peroxidase de rábano silvestre, HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*). A placa foi

mantida em incubação a 25°C por 60 min, sob agitação orbital a 300 rpm, período este suficiente para permitir a ligação do conjugado ao sHLA-G amostral capturado na placa. Novas lavagens (com PBS, por 5 vezes) seguiram-se ao período de incubação e a solução cromógena tetrametilbenzidina associada ao peróxido de hidrogênio, substrato da peroxidase, foi adicionada. A placa, protegida da luz, foi incubada sem agitação por 25 min a 25 °C permitindo a reação de ligação da enzima peroxidase ao substrato, formando um produto de coloração azul. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de solução contendo ácido sulfúrico. A adição da solução de parada resultou na mudança de coloração para amarelo e a leitura das absorbâncias foi realizada 5 min após a parada da reação, no espectrofotômetro *KC Jr. (Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, EUA)* em comprimento de onda de 450 nm e sob as condições previamente padronizadas, conforme descrição a seguir. O limite de detecção informado na bula foi de 0,6 U/ml.

As amostras de soro foram utilizadas em sua concentração original (sem diluição), conforme indicação da bula. No caso do fluido peritoneal procedeu-se à padronização da diluição de uso, uma vez que o fabricante não a especificara. Para tanto, quatro amostras de fluido peritoneal foram previamente testadas sob as formas integral e diluída 4 vezes (em Tampão de Diluição fornecido no *Kit*, pronto para uso); como resultado verificou-se que as amostras integrais apresentaram concentrações dentro dos limites da curva de calibração de sHLA-G (proposta pelo fabricante para a realização das leituras de densidade óptica). Desta forma, padronizou-se a utilização

do fluido peritoneal em sua forma integral e, eventuais amostras que ultrapassassem o limite superior da curva de calibração (125 U/ml), seriam reavaliadas efetuando-se as diluições necessárias.

As amostras (100 μ l) foram testadas em duplicata e as densidades ópticas medidas no referido espectrofotômetro, com filtragem em 450 nm e comprimento de onda de referência de 630 nm. A concentração final das amostras foi determinada pela densidade óptica de acordo com a curva padrão (intervalo 0 -125 U/ml). As amostras de soro ou fluido peritoneal que eventualmente ultrapassaram o limite superior de absorbância foram reavaliadas a partir de diluições maiores, em repetição do ensaio.

5.3.2 Detecção do transcrito gênico de HLA-G por qRT-PCR

Visando a realização dos ensaios de qRT-PCR, procedeu-se inicialmente à lise dos tecidos congelados (pela técnica automatizada de lise a frio), seguida das extrações de RNA total (pela técnica com *Trizol*®), cálculo das concentrações de RNA total (a partir da medida da densidade óptica em espectrofotômetro) e às sínteses de DNA complementar (cDNA), segundo os protocolos técnicos descritos a seguir.

5.3.2.1 Lise de Tecidos, extração e análise da integridade do RNA total

Amostras de tecido de endométrio pesando cerca de 100 mg, foram lisadas com o intuito de formar homogenatos do tecido. Para tanto, utilizou-

se o equipamento *Precellys®* (*Bertin Technologies*, França), que realiza lise a frio de amostras distribuídas em tubos contendo esferas metálicas e preenchidos com 1 ml de *Trizol®* (*Invitrogen*, EUA). O equipamento de lise foi mantido resfriado com nitrogênio líquido até cerca de 8°C e programado para 3 ciclos de rotação a 6.800 rpm, por 15 segundos, intercalados por pausa de 20 segundos a cada ciclo.

A extração do RNA se deu pelo método baseado em Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando-se os homogenatos de tecido em meio à solução de *Trizol®*. O *Trizol* é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. A extração do RNA total se deu pela transferência dos homogenatos de tecido em *Trizol®* para tubos de 1,5 ml (*RNAase/DNAase free*) e adição de 0,2 ml de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material permaneceu em incubação por 3 minutos à temperatura ambiente; posteriormente, foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, para permitir a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 ml de álcool isopropílico, com o intuito de precipitar o RNA. Cada tubo foi homogeneizado por inversão e, após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugado novamente a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA, lavado com 500 µl de etanol 75% e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Descartado o sobrenadante de etanol (com micropipeta), o tubo com RNA total assim obtido foi deixado secar por 5

minutos (para evaporação dos resíduos de etanol) e o RNA, ressuspensão em 30 µL de água deionizada (*Milli-Q®*, *Millipore*, EUA).

Em seguida à extração do RNA total, a concentração de RNA dada em ng/µL, foi calculada em cada tubo a partir da medida da densidade óptica no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA). Além da concentração, a medida espectrofotométrica forneceu a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (razão 260/280 nm), indicativa do teor de contaminação dos ácidos nucleicos por proteínas, tendo sido considerados os valores de razão entre 1,8 e 2,0 como aceitáveis, representativos de baixa contaminação e de boa qualidade do ácido nucléico.

A integridade do RNA total foi avaliada utilizando-se o equipamento 2100 *Bioanalyser* (*Agilent Technologies*, EUA), segundo o princípio de separação eletroforética em matriz de gel aplicado nos capilares de *chip* contendo uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos aos marcadores e ao RNA resulta em fluorescência que é quantificada, permitindo a separação dos RNA ribossômicos 18S e 28S e a atribuição de um número de integridade (RIN, do inglês, *RNA integrity number*), que varia de 1 a 10, gerado pelo software do equipamento juntamente com uma imagem representativa das bandas 28S e 18S no gel. Segundo Fleige e Pfaffl, 2006, foram consideradas satisfatórias as amostras que apresentaram valores de RIN superiores a 5 para aplicação em técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os valores individuais do RIN de cada amostra, bem como um exemplo do resultado gerado pelo software, estão demonstrados no Anexo IX. Após as avaliações de

qualidade, os tubos contendo as amostras de RNA total foram mantidos a -80°C até o momento da utilização para a síntese de cDNA.

5.3.2.2 Síntese de cDNA

A síntese das moléculas de DNA complementar (cDNA) se deu a partir de alíquotas equivalentes a 1 µg de RNA amostral e o volume completado para 5,5 µl com água deionizada. Seguiu-se com o tratamento para eliminação de resíduos de DNA nas amostras, pela adição de 2,0 µl da enzima DNase-I (1U/µl) (*RNAse free, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA*), 0,5 µl (20U) da enzima *RNaseOUTTM* (40U/µl) (*Invitrogen*) e 2,0 µl solução tampão *5X Buffer 1st Strand* (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA*), obtendo-se um volume total de 10 µl de solução. As amostras foram então incubadas a 37°C por 10 min e depois, a 75°C por 5 min. Seguiu-se com a adição dos reagentes para a reação em cadeia da polimerase (PCR), a saber: 1,0 µl de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (10 nM) (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific, EUA*); 0,5 µl de *primer Oligo_{dT18}* (500 µg/ml) (*Fermentas*), para mRNA poli A; 0,5 µl de *Random primer* (100ng/ul), primer para mRNA não-poli A e 1 µl de água deionizada, totalizando 13,0 µl de solução por tubo. Cada tubo foi, então, incubado a 65°C por 10 min e, após, colocado imediatamente no gelo por 1 minuto. Em seguida, os demais reagentes da PCR foram adicionados: 4 µl do tampão da enzima *SuperScript® III*, (*Buffer 5x, Invitrogen*); 01 µl de Ditiotretitol 5 mM (*Invitrogen*); 0,5 µl (20U) de *RNaseOUTTM* (40U/µl) (*Invitrogen*); 1µl da

enzima transcriptase reversa (*SuperScript® III, Invitrogen*) e 0,5 µl água deionizada, totalizando 20 µl de solução por tubo. A reação de síntese de cDNA ocorreu em três ciclos de incubação: a 25°C por 10 min, seguida de incubação a 55°C por 2 horas e a 75 °C por 15 min. As amostras de cDNA assim sintetizadas foram diluídas a 1:3, adicionando-se 40ul de água DEPC (Dietilpirocarbonato), (*Sigma-Aldrich, Alemanha*) e estocadas em freezer a -20°C até o momento do uso nas reações de qRT-PCR.

5.3.2.3 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Desenho, padronização e eficiência dos primers

A partir das amostras de cDNA sintetizadas, procedeu-se às reações de PCR quantitativas em tempo real (qRT-PCR). Entretanto, esta etapa foi precedida da elaboração das moléculas iniciadoras da reação (par de *primers foward e reverse*), as quais foram específicas para as isoformas de membrana do gene alvo (mHLA-G contido no cDNA).

O desenho dos pares de *primers* foi realizando utilizando-se o programa computacional *Primer Blast*, disponível no sítio eletrônico do NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast. Os pares de primers foram desenhados respeitando as especificações requeridas, a saber: tamanho do fragmento (entre 50-150bp), percentual de pares de bases CG (entre 30-60%), baixa capacidade de homo- ou heterodimerização, temperatura de anelamento (entre 58-60°C). Além disso, os desenhos dos *primers* se fizeram estendendo-se entre dois exons diferentes do gene, a fim de evitar

coamplificação de eventual DNA genômico contaminante. No caso do gene HLA-G, os exons 6 e 7 constituíram a região utilizada para o desenho dos *primers*, uma vez que transcrevem a região transmembrana e citoplasmática, respectivamente. Os mesmos parâmetros foram aplicados para desenhar pares de *primers* do gene β -actina, de expressão endógena regular e que serviu de normalizador da expressão relativa do gene HLA-G, alvo do estudo.

As sequências gênicas de referência, que serviram de base para desenhar os pares de *primers*, foram extraídas do banco de dados genômicos *NCBI Reference Sequence*, no sítio eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> e estão catalogadas sob as seguintes denominações de acesso: NG_029039.1, sequência referência do gene HLA-G, no cromossomo 6 humano; NG_007992.1, sequência referência do gene β -actina, no cromossomo 7 humano (Figura 4).

Reações qRT-PCR foram previamente realizadas para testar os diferentes pares de *primers*, tanto do gene mHLA-G como do normalizador β -actina (explicado mais adiante), a fim de eleger o par de *primers* com melhor eficiência de amplificação e padronizar a sua concentração de uso, bem como a concentração amostral de cDNA a ser utilizada.

A análise da eficiência de amplificação se fez necessária uma vez que o ganho de amplificação dificilmente chega a dobrar a quantidade do produto a cada ciclo de reação, dado que a eficiência de amplificação dos *primers* raramente atinge os 100%. Para tanto, foi preparada uma mistura (*pool*) de diferentes amostras de endométrios e lesões de endometriose, a

partir das amostras de cDNA 1:3 estocadas, sendo a mistura diluída em série nas concentrações 1:10, 1:30, 1:60, 120 e 1:240. A série de diluições do *pool* de cDNA amostral foi testada frente a diferentes concentrações dos *primers* (alvo e endógeno), a saber: 50, 100, 200, 400 e 600 nM. Estes ensaios permitiram determinar a concentração ótima de cada par de *primers*, caracterizada pela menor concentração onde o *Ct*, ciclo de início da amplificação exponencial (do inglês, *threshold cycle*, explicado mais adiante) e o perfil da curva de amplificação não apresentem grandes variações em relação às maiores concentrações, observando-se a menor formação de dímeros de *primers* (quando presentes).

Os desenhos dos pares de *primers* (HLA-G e β -actina) que mostram melhores perfis da curva de amplificação e, portanto, foram padronizados para uso, estão mostrados na figura 4.

Uma vez identificada a melhor concentração de uso para cada par de *primer* (HLA-G, 100 nM e β -actina, 200nM), os mesmos foram testados nas respectivas concentrações com o intuito de verificar as suas eficiências de amplificação frente às diferentes concentrações do *pool* de cDNA, bem como padronizar a concentração amostral de uso. Tais ensaios permitiram a construção das curvas que representam a real taxa de amplificação, que nem sempre resulta em 100%. A regressão linear dos valores de *Cts* em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a , em $y=ax+b$) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação (E_f) do produto, segundo fórmula $E_f = 10^{-1/a}$ ou $E_f (\%) = (E_f - 1) \times 100$.

A. Produto de amplificação do gene HLA-G, contendo 102 bp, compreendido entre os exons 6 e 7.						
ATCGTTGCTGGCCTGGTTGTCCTTGCAGCTGTAGTCACTGGAGCTGCGGTCGCTGCTGTGCTGTGGAGA AAGAAGAGCTCAGATTGAAAAGGAGGGAGCTAC						
B. Desenhos e características físico-químicas dos <i>primers</i> mHLA-G e β -actina.						
Gene	Sequência Referência (NG)		Sequência do primer (5'→3')	Tamanho (bp)	Tm (°C)	CG (%)
HLA-G	NG_029039.1	<i>forward</i>	ATCGTTGCTGGCCTGGTT	18	59,56	55,56
		<i>reverse</i>	GTAGCTCCCTCCTTTTCAATCTG	23	58,80	47,83
β -actina	NG_007992.1	<i>forward</i>	GGCACCCAGCACAATGAAG	19	59.41	57.89
		<i>reverse</i>	CCGATCCACACGGAGTACTTG	21	60.47	57.14

Adaptada do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Figura 4. Região gênica de amplificação do HLA-G, desenhos e características físico-químicas dos pares de primers mHLA-G e β -actina. **A:** Fragmento gênico HLA-G amplificado compreende as regiões transmembrana e citoplasmática da proteína HLA-G, localizadas entre os exons 6 e 7. **B:** Representação e características dos pares de *primer* mHLA-G e par β -actina que apresentaram melhor perfil da curva de dissociação na reação de amplificação. mHLA-G, HLA-G de membrana; bp, pares de bases; NG, N° do Gene na base de dados NCBI; 5'→3', sentido de elongação do ácido nucleico- da extremidade fosfatada 5' para a extremidade 3' hidroxilada; *forward*, *primer* iniciador da fita anti-senso (3'→5') do ácido nucleico; *reverse*, *primer* iniciador da fita senso (5'→3') do ácido nucleico; T_m, Temperatura de dissociação do *primer*, do inglês *Melting*; CG, percentual de ocorrência das bases Citosina e Guanina na molécula do *primer*.

No presente caso o coeficiente angular obtido para o *primer* β -actina foi de aproximadamente -3,6 e para o *primer* HLA-G, -3,3, resultando nas eficiências de amplificação próximas a 89% e 97%, respectivamente (β -actina, Ef=1,89; HLA-G, Ef=1,97), conforme os cálculos demonstrados na Figura 5.

Segundo Pfaffl (2001), valores de eficiência entre 1,8 e 2,2 significam reprodutibilidade e exatidão na cinética de amplificação, portanto os valores de eficiência obtidos para os *primers* HLA-G e β -actina foram considerados satisfatórios.

Quanto à concentração do cDNA usada para amplificar todas as amostras, a diluição 1:30 se mostrou suficiente, segundo indicam ambas as curvas de eficiência (Figura 5), portanto, foi a escolhida.

Figura 5. Cálculo da Eficiência dos primers HLA-G e β -actina. Regressão linear e cálculo das eficiências (Ef) dos primers mHLA-G (A) e β -actina (B), a partir dos coeficientes angulares das respectivas retas.

Características dos ensaios de qRT-PCR

As reações qRT-PCR foram realizadas em triplicata, em placas de 96 poços no equipamento *Perkin-Elmer ABI Prism 7500 sequence detection system* (Applied Biosystems, EUA). A detecção do produto da reação de amplificação se deu através dos fluoróforos *ROXTM* e *SYBR® Green*,

contidos no reagente *Fast SYBR® Green Master Mix*, do mesmo fabricante; integram ainda a composição deste reagente, os dNTPs, a enzima DNA polimerase (termoestável) e solução tamponante, essenciais à reação de amplificação de ácidos nucleicos. As reações se deram em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, seguidas de 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual de instruções do fabricante. A cada poço reacional foram adicionados 6 µl do reagente *Fast SYBR® Green Master Mix*, 3 µl da solução de *primers* (*foward* e *reverse*) e 3 µl da solução amostral de cDNA diluída 1:30, totalizando um volume de reação de 12 µl em cada poço da placa.

A intensidade de fluorescência na reação foi determinada pelo equipamento de amplificação, segundo o cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ representa a intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação; Rn^- , por sua vez, representa a intensidade de emissão do SYBR Green / intensidade de emissão do ROX antes da amplificação. O fluoróforo ROX é utilizado como controle interno passivo, pois emite fluorescência de intensidade constante durante toda a reação. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação, de modo que os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação, levando o ΔRn a ultrapassar a linha de base. Para a quantificação da expressão de cada gene foi estabelecido um valor de ΔRn , correspondente à linha de corte (*Threshold*), ponto da curva onde se inicia a amplificação exponencial promovida por cada par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔRn cruza

o ponto de corte corresponde ao “ciclo de corte” ou *Threshold Cycle (Ct)*, proporcional à quantidade de mRNA amplificada na amostra. O valor de *Ct* é preditivo da quantidade de mRNA *primer*-específico presente na amostra e quanto menor o seu valor, maior é quantidade de mRNA presente.

As amostras de endométrios (CTRL e EDT) foram amplificadas em triplicatas com o *primer* do gene HLA-G e com o *primer* do gene de referência β -actina (endógeno). O valor médio de *Ct*, tanto na amplificação do primer HLA-G como do β -actina foi calculado a partir de cada triplicata amostral. A diferença dentro de cada amostra entre a média de *Ct* do gene HLA-G e a média de *Ct* do gene β -actina representa a expressão do gene alvo (HLA-G), dada pela equação $\Delta Ct = Ct_{\text{HLA-G}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$. O valor de ΔCt é inversamente proporcional à expressão do gene alvo, portanto, quanto menor o valor de ΔCt maior será a quantidade de mRNA do gene HLA-G presente na amostra.

5.3.3 Detecção da proteína HLA-G por imunohistoquímica

Vizando a confecção das lâminas para posteriores ensaios imunohistoquímicos, os fragmentos de tecidos preservados em blocos de parafina foram submetidos à microtomia, gerando secções laminares de aproximadamente 3 μm de espessura, com os quais se prepararam as lâminas silanizadas com 3-Aminopropil-trietoxi-silano (*Sigma-Aldrich*, Alemanha). As lâminas do grupo CTRL constituíram-se de amostras do tecido endometrial. Com relação ao grupo EDT, cada lâmina conteve uma

secção de tecido endometrial e uma secção da lesão de endometriose, correspondentes à mesma paciente. Do total de 26 pacientes no grupo EDT, 15 referiram-se a casos de doença no retossigmóide e 11 na região retrocervical.

O anticorpo primário (anti-HLA-G) usado nos ensaios de imunohistoquímica foi o anticorpo monoclonal purificado isotipo *Mouse IgG1*, clone 4H84 (*Exbio*, República Tcheca), com imunogenicidade específica para os aminoácidos 61 a 83 da proteína HLA-G humana, comum a todas as isoformas (Menier et al., 2003). O anticorpo (Ac) 4H84 liofilizado foi ressuspenso em solução tamponada de PBS com 15mM de azida sódica, atingindo a concentração de 1mg/ml e pH 7,4, conforme instruções do fabricante, e estocado a 8°C até o momento do uso. Sua concentração de uso foi previamente padronizada, testando-se as diluições 1:100, 1:500 e 1:1.000 com réplicas de algumas lâminas contendo amostras de tecidos de endométrio e de lesões de endometriose, tendo sido eleita a concentração de uso 1:100 (ou 10µg/ml), segundo avaliação feita por médico patologista.

Amostra de tecido placentário parafinado foi utilizada para a confecção de lâminas que serviram de “controle-positivo” para a reação de imunohistoquímica com o Ac anti-HLA-G, tanto durante a padronização do título do anticorpo, como nos testes com as lâminas amostrais. As lâminas “controle-positivo” foram processadas de maneira semelhante às lâminas de amostras em teste. Como lâmina “controle-negativo” da reação, admitiu-se a substituição do anticorpo primário por solução tampão fosfato-salina (PBS). Como Ac secundário, utilizou-se o Ac biotinilado IgG-*mouse* do *Kit*

VECTASTAIN, produzido por *Vector Laboratories* (Burlingame, EUA), diluído 1:100, conforme instruções do fabricante.

A técnica de imunohistoquímica foi baseada na detecção de cromógeno pelo método da avidina-biotina-peroxidase HPR⁶. A técnica foi precedida da preparação das lâminas com os cortes histológicos, obedecendo aos protocolos de desparafinização, hidratação e recuperação antigênica, seguidos dos protocolos de bloqueio da peroxidase endógena e incubação com os anticorpos, todos conforme as descrições a seguir.

As lâminas silanizadas foram desparafinadas em xilol a quente, em estufa a 60-65°C, durante 5 minutos e posteriormente passadas rapidamente por 3 banhos de xilol a frio. A hidratação se deu em duas etapas de banho em etanol, sendo a primeira em etanol 95% e a segunda em etanol 70%, intercaladas por lavagens, em água corrente e em água deionizada e finalizada com banho em ácido fórmico puro, por 3 minutos, seguido do mesmo padrão de lavagens, após as quais, as lâminas foram colocadas em tampão PBS. A recuperação antigênica⁷ foi obtida por alta temperatura (Shi et al., 1991), utilizando-se tampão de citrato 10 mM em pH 6 (Shi et al.,

⁶ Método da avidina-biotina-peroxidase: Método imunoenzimático para identificação de antígeno, baseado na detecção do conjugado avidina-biotina-peroxidase, complexado a cromógeno, como a diaminobenzidina (DAB), associado a peróxido de hidrogênio. Inicialmente, há a formação do complexo antígeno-anticorpo primário; depois, um anticorpo secundário marcado com biotina reage com esse complexo; por fim, um complexo protéico de avidina e peroxidase de rábano silvestre (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*) se liga às biotinas do anticorpo secundário; o complexo resultante reage com o peróxido de hidrogênio associado a DAB, emitindo uma coloração amarronzada.

⁷ Recuperação antigênica consiste no processo de reversão da estrutura tridimensional da proteína alterada pela fixação em formalina. A fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os aminoácidos de peptídeos de uma determinada proteína com aminoácidos de proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epitopos alvo, mascarando o antígeno.

1993), aquecendo-se as lâminas a 125°C, por 1 minuto, em panela de pressão (*S2800-Dako Cytomation*, Terapeak Inc, CA). O bloqueio da peroxidase endógena⁸ se fez em banho de água oxigenada 3%, por 5 min, repetido por quatro vezes. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e em PBS/ Tween® (solução detergente tamponante). Em seguida, utilizando-se micropipeta, foi adicionado, sobre cada secção laminar, o Ac primário diluído 1:100 em diluente de anticorpos *Spring ADS125* (*Spring*, EUA) e incubadas as lâminas, de um dia para outro, em câmara úmida (4-8°C). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes, mergulhando-as por 3 minutos em solução PBS a cada vez. Seguiu-se com a adição do Ac secundário biotilado (igualmente diluído) e incubadas as lâminas, por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes (PBS por 3 min) e o complexo avidina-biotina conjugado com peroxidase (*ABC KIT Vectastain Elite Mouse IgG*, *Vector Laboratories*, EUA) foi então adicionado. As lâminas foram mais uma vez incubadas (por 30 min a 37°C), lavadas (por 3 vezes com PBS, por 3 min) e imersas em solução de peróxido de hidrogênio associado a cromógeno DAB⁹ (diaminobenzidina). Aguardou-se cerca de 5 minutos—tempo suficiente para se dar a reação cromogênica, após o qual, as lâminas

⁸ Bloqueio da peroxidase endógena se faz necessário uma vez que as células possuem diferentes enzimas peroxidases. Quando as peroxidases endógenas não são bloqueadas, ao se aplicar o DAB, ocorre reação cruzada entre este e as enzimas, impedindo a diferenciação da reação antígeno-anticorpo combinada ao conjugado avidina-biotina-peroxidase, gerando reações falso-positivas.

⁹ Solução DAB associada a peróxido de hidrogênio: Preparada com 140 mg de hidrato de tetrahydroclorido-diaminobenzidina diluído em 20 mL de solução tampão Tris-HCl (10x) e água destilada qsp 210 mL. No momento do uso foram acrescentados 30 µL de água oxigenada 30 Volumes.

foram lavadas, por 10 minutos, em água corrente e a contra-coloração realizada com Hematoxilina de *Harris*. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente, por 5 minutos e desidratadas em banhos de etanol, na seguinte sequência: etanol 70% (1min), etanol 95% (1 min) e 3 banhos de etanol 100% (1 min). Finalmente, as lâminas foram diafanizadas, em 3 banhos de xilol (cerca de 1 min cada) e montadas as lamínulas com resina sintética para posterior avaliação microscópica, feita por médico patologista.

A análise das reações imunohistoquímicas, de acordo com a quantidade de marcações cromogênicas e intensidade da coloração, se deu pela atribuição de notas (*scores*), segundo a graduação indicada na Tabela 1 (Borrelli et al., 2016). O produto do *score* de intensidade (*score I*) multiplicado pelo *score* da distribuição (*score D*), representativo do percentual de células marcadas, resultou no *score* de imunorreatividade (IRS). A atribuição de *scores* na avaliação das secções de tecido foi individualizada por região — epitélio glandular e estroma, tendo sido considerada a média entre os *scores* de expressão glandular (IRS Glandular) e estromal (IRS Estromal), como *score* final da imunorreatividade no tecido (IRS Final).

Tabela 1. Critério de avaliação da marcação imunohistoquímica de HLA-G no epitélio glandular e no estroma de secções de tecidos de endométrio e de lesão de endometriose.

Distribuição da marcação IHQ		Intensidade da marcação IHQ		Score de Imunorreatividade (IRS)
células marcadas (%)	Nota da Distribuição score (D)	Nota da Intensidade score (I)	Intensidade da Coloração	(D) x (I)
0	0	0	sem marcação	0 a 12
1 a 25	1	1	amarelo claro	
26 a 50	2	2	amarelo escuro	
51 a 75	3	3	marrom claro/escuro	
76 a 100	4			

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas tiveram a normalidade avaliada pelos testes de Kolmogorov-Smimov e Shapiro Wilk. Os dados se mostraram todos não paramétricos e foram comparados usando-se o teste *Mann-Whitney U* para duas amostras independentes ou o teste Kruskal–Wallis com pós teste *Müller-Dunn* para múltipla comparação no caso de três ou mais amostras. Análises de correlação foram efetuadas através do teste de postos de Spearman e consideradas fortes as correlações cujo coeficiente de Spearman (r) tenha sido superior a 0,8.

Em todas as análises estatísticas, os valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa computacional *GraphPad Prism 5 Software* (GraphPad Software, Inc., EUA).

6. RESULTADOS

6.1 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HLA-G SOLÚVEL NO SORO E NO FLUIDO PERITONEAL

Os dados clínicos das pacientes dos grupos CTRL e EDT, bem como os valores das concentrações da proteína HLA-G solúvel (sHLA-G) estão discriminados no Anexo VI, que traz as concentrações detectadas no soro e no fluido peritoneal (FP) dos grupos CTRL (Anexo VI.a) e EDT (Anexo VI.b). Baseado nas informações dos referidos anexos, seguem abaixo a demonstração dos resultados e os comparativos entre os grupos amostrais.

Considerando a totalidade das pacientes em cada um dos grupos (CTRL e EDT), a comparação entre as concentrações de sHLA-G no soro e no fluido peritoneal (FP) mostrou que a expressão da proteína solúvel é significativamente maior nos fluidos peritoneais, tanto no grupo CTRL ($p < 0,0001$) como no grupo EDT ($p < 0,0001$) (Tabela 2 e Figura 6.A). Já na comparação entre os grupos amostrais (CTRL *versus* EDT), não houve diferença significativa entre os soros ($p = 0,195$), tampouco entre os fluidos peritoneais ($p = 0,743$), conforme indicam a Tabela 2 e a Figura 6.B.

A análise de correlação entre soro e FP resultou em fraca correlação no grupo EDT ($r = 0.205$; $p = 0.0184$) e nenhuma correlação no grupo CTRL ($r = 0.0849$; $p = 0.485$) (gráficos não mostrados).

Tabela 2. Comparativos entre as concentrações de sHLA-G (U/ml) nos soros e nos fluidos peritoneais dos grupos Controle e Endometriose.

	Controle (n=70)		Endometriose (n=132)		CTRL x EDT (70 x 132)
U/ml	Mediana (min-max)	p^a	Mediana (min-max)	p^a	p^b
Soro	5,8 (0,0-36,9)		6,2 (0,0-140,4)		0,195
FP	32,4 (3,3-136,4)		28,0 (4,0-254,7)		0,743
	< 0.0001		< 0.0001		

^a Valor p na comparação entre Soro e Fluido Peritoneal (FP) intra-grupo.

^b Valor p na comparação entre os grupos Controle (CTRL) e Endometriose (EDT).
Teste estatístico *Mann Whitney U*.

Figura 6. Concentrações de sHLA-G (U/ml) no soro e fluido peritoneal (FP) de mulheres com e sem endometriose. **A.** Comparativos entre soro e FP nos grupos Controle (CTRL) e Endometriose (EDT). **B.** Comparativos entre os soros e entre os fluidos peritoneais, CTRL *versus* EDT. As barras horizontais representam as medianas (negritadas) e os intervalos interquartis; n/s, não significativo ($p > 0,05$). Teste estatístico *Mann Whitney U*.

As concentrações de sHLA-G nos soros e nos fluidos peritoneais também foram avaliadas de acordo com as diferentes fases do ciclo

menstrual, independentemente do estágio ou tipo de EDT, conforme demonstra a Tabela 3. A concentração de sHLA-G no soro não apresentou diferença entre as fases do ciclo menstrual, tanto no grupo CTRL ($p=0,567$) como no grupo EDT ($p=0,357$). Em relação ao FP, foi possível observar uma preponderância nos níveis de sHLA-G na fase menstrual, mas apenas no grupo EDT ($p=0,031$). Quando da comparação entre os grupos CTRL *versus* EDT, não houve diferença em nenhuma das fases do ciclo menstrual, conforme indicam os valores de significância estatística (p) na Tabela 3.

Tabela 3. Comparativos entre as concentrações de sHLA-G (U/ml) nos grupos Controle e Endometriose, de acordo com a fase do ciclo menstrual.

	Fase Hormonal	CTRL			EDT			CTRL x EDT
		<i>n</i>	mediana (min-max)	p^a	<i>n</i>	mediana (min-max)	p^a	p^b
SORO	Menstrual	4	3,7 (0,0-12,2)	0,567	5	4,1 (3,4-79,3)	0,357	0,413
	Proliferativa	28	5,6 (0,2-33,8)		36	9,9 (0,0-83,4)		0,106
	Secretora	29	6,2 (0,0-36,9)		86	5,8 (0,0-140,4)		0,750
	Não Referida	9	4,3 (1,5-8,9)		5	2,1 (0,54-18,2)		0,190
FP	Menstrual	4	34,5 (23,5-65,6)	0,843	5	137,5 (16,2-254,7)	0,031	0,190
	Proliferativa	28	32,7 (5,9-136,4)		36	31,7 (5,6-210,8)		0,670
	Secretora	29	28,6 (3,3-100,9)		86	27,6 (4,0-174,7)		0,679
	Não Referida	9	41,8 (14,2-73,8)		5	24,3 (10,0-31,9)		0,083

^a p , índice de significância estatística na comparação entre as fases do ciclo menstrual intra-grupo, excetuando-se fase do ciclo "Não Referida"; teste estatístico Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

^b p , índice de significância estatística na comparação entre os grupos CTRL e EDT, calculado para cada fase do ciclo menstrual; teste estatístico *Mann-Whitney U*.

EDT, endometriose; CTRL, controle; FP, fluido peritoneal; *n*, número amostral.

As concentrações de sHLA-G no soro e no FP foram também avaliadas considerando-se as pacientes segmentadas de acordo com os estádios, iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da endometriose, bem como considerando-se os diferentes tipos de endometriose, classificados de acordo com os sítios de manifestação da doença. O detalhamento dos

valores referentes a essas concentrações, bem como das comparações estatísticas com o grupo CTRL constam no Anexo VII e estão representados pelas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Concentrações de sHLA-G (U/ml) de acordo com estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da endometriose. A. Comparativo entre soro do grupo Controle (CTRL) e subgrupos Endometriose (II/II) e (I/IV); **B.** Comparativo entre fluido peritoneal (FP) do grupo Controle (CTRL) e subgrupos Endometriose (II/II) e (I/IV). *n*, número amostral; n/s, não significativo ($p>0,05$); teste estatístico *Mann Whitney U*.

Figura 8. Concentrações de sHLA-G (U/ml) de acordo com os tipos de endometriose. A. Comparativo entre soro do grupo Controle (CTRL) e dos subgrupos Endometriose; **B.** Comparativo entre Fluido Peritoneal (FP) do grupo CTRL e dos subgrupos Endometriose. SUP, endometriose superficial; EOMA, endometrioma; PFD, endometriose profunda; EOMA/PFD, endometrioma associado à endometriose profunda; *n*, número amostral. Barras horizontais representam as medianas (negritadas) e os intervalos interquartis; (*), $p \leq 0,05$; teste estatístico *Mann Whitney U* nas comparações com grupo CTRL.

Considerados os estádios da EDT, a concentração de sHLA-G no soro das mulheres em estádios avançados (III/IV) mostrou-se significativamente maior que no grupo CTRL ($p=0,05$); na comparação dos soros entre os grupos CTRL e EDT inicial (I/II), por sua vez, não houve diferença significativa (Figura 7.A; Anexo VII.a). Já a comparação entre os fluidos peritoneais não mostrou diferença significativa do grupo CTRL em relação ao grupo EDT inicial (I/II) ou avançada (III/IV) (Figura 7.B; Anexo VII.a).

Admitidas as diferentes localizações (Tipos) da EDT, as doentes que possuíam endometrioma ovariano (EOMA) e aquelas que acumulavam a forma ovariana e profunda da doença (EOMA/PFD) apresentaram níveis

mais elevados de sHLA-G no soro, comparativamente ao grupo CTRL. (Figura 8.A, Anexo VII.b). Já em relação ao FP, não houve diferença significativa entre as concentrações de sHLA-G nas diferentes formas de manifestação e/ou acumulação da doença (Figura 8.B; Anexo VII.b).

Cabe salientar que dentre as 51 doentes que possuíam endometrioma (EOMA)– 9 com EOMA e 42 com EOMA associado à doença profunda (EOMA/PFD)– 49 delas (96%) apresentavam-se nos estádios avançados da doença, como demonstra a Tabela 4, que traz a distribuição das lesões de endometriose de acordo com os estádios da doença. Portanto, os níveis de sHLA-G mais elevados encontrados no soro das mulheres que possuíam EOMA esteve associado aos estádios avançados (III ou IV) da endometriose.

Tabela 4. Distribuição das lesões de endometriose segundo sua localização na pelve e de acordo com os estádios iniciais (I/II) ou avançados (III/VI) da doença.

	Estádios	
	I/II	III/IV
Localização	Frequência (%)	
Superfície dos tecidos (SUP) ^a	15 (11)	0 (0)
Endometrioma ovariano (EOMA) ^b	0 (0)	9 (7)
Endometriose Profunda (PFD) ^c	38 (29)	28 (21)
EOMA mais PFD (EOMA/PFD) ^d	2 (2)	40 (30)
Total	55 (42)	77 (58)

^a SUP, lesões presentes apenas na superfície do peritônio ou de outros órgãos pélvicos.

^b Endometrioma (EOMA) sem a presença de endometriose profunda (PFD), com ou sem a presença de lesões SUP.

^c PFD sem a presença de EOMA, com ou sem a presença de lesões SUP.

^d Presença concomitante de EOMA e PFD, com ou sem a presença de lesões SUP.

6.2 EXPRESSÃO DO mRNA HLA-G NO ENDOMÉTRIO

Os quadros constantes no Anexo VIII trazem os valores de Ct médio das triplicatas amostrais referentes à amplificação dos genes HLA-G e β -actina e os correspondentes valores de Δ Ct, bem como as características clínicas das mulheres dos grupos CTRL (VIII.a) e EDT (VIII.b) incluídas na avaliação da expressão do mRNA HLA-G nos tecidos de endométrio.

Importante notar no Anexo VIII.b que, dentre as 24 mulheres do grupo EDT, apenas 1 possuía endometriose em estágio 2, tendo todas as demais endometriose nos estádios 3 ou 4. Portanto, a expressão gênica verificada é preponderantemente relativa às mulheres em estádios avançados da endometriose (96%).

A expressão de mRNA HLA-G no endométrio das mulheres de ambos os grupos está indicada na Figura 9, pelo valor de $1/\Delta$ Ct, uma vez que a expressão dos genes é inversamente proporcional ao valor de Δ Ct. A comparação estatística entre os grupos mostra que o endométrio típico das mulheres com endometriose (EDT) apresentou menor expressão de HLA-G que o endométrio Controle (CTRL) ($p=0,0035$) (Figura 9).

Figura 9. Expressão gênica de HLA-G no endométrio de mulheres com e sem endometriose. Expressão de mRNA de HLA-G normalizada pelo gene endógeno β -actina nas amostras de endométrio de mulheres dos grupos Controle (CTRL) e Endometriose (EDT). Valores de ΔC_t representam a diferença entre a média de C_t do gene HLA-G e a média de C_t do gene β -actina em cada amostra. A expressão do gene HLA-G está representada pelos valores de $1/\Delta C_t$, uma vez que a expressão gênica é inversamente proporcional ao valor de ΔC_t . Barras horizontais representam a mediana; teste estatístico *Mann Whitney U*.

6.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA HLA-G NO ENDOMÉTRIO E NA ENDOMETRIOSE

O Anexo X traz as notações (*scores*) referentes à detecção cromogênica da proteína HLA-G nos grupos CTRL (X.a) e EDT (X.b). Para a atribuição das notas (*scores*) às secções dos tecidos de endométrio e de lesão de EDT, considerou-se a distribuição da proteína segundo a região de sua expressão – glandular e/ou estromal, bem como a intensidade da

coloração imunohistoquímica. Os scores finais (IRS Final), representativos da média entre a expressão glandular e estromal, serviram de base para as avaliações estatísticas da expressão de HLA-G no endométrio do grupo CTRL (Tabela 5) e nos tecidos de endométrio e de lesões do grupo EDT (Tabela 6). Já os comparativos entre os grupos amostrais, considerando-se as variáveis clínicas “Estádio da EDT” e “Fase do ciclo menstrual” estão demonstrados na Tabela 7 e Figura 11, respectivamente.

Os dados constantes no Anexo X.a indicam que a expressão de HLA-G no endométrio de mulheres do grupo CTRL se deu exclusivamente no epitélio glandular, não havendo expressão no estroma em nenhuma das amostras de tecido endometrial no grupo. De forma semelhante, no grupo EDT (Anexo X.b) a expressão de HLA-G se deu eminentemente no epitélio glandular, tanto no endométrio como nas lesões de endometriose, tendo ocorrido raramente no estroma, com baixa intensidade e distribuição em apenas 5 dos 26 casos. A Figura 10 traz exemplos representativos da expressão da proteína HLA-G nos tecidos de endométrio e de lesão de endometriose.

Tabela 5. Avaliação estatística dos scores de imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no epitélio glandular e estroma dos endométrios do grupo Controle.

CTRL (n=22)	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL	Idade
Valor Mínimo	1,0	0,0	0,5	25,0
Percentil 25	3,0	0,0	1,5	28,3
Valor Mediano	4,0	0,0	2,0	32,5
Percentil 75	6,5	0,0	3,3	36,5
Valor Máximo	12,0	0,0	6,0	46,0
Valor Médio	5,3	0,0	2,7	32,8
Desvio Padrão	2,9	0,0	1,4	5,9

IRS Final, média entre o IRS Epitelial e IRS Estromal.

Tabela 6. Avaliação estatística dos scores de imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no epitélio glandular e estroma dos endométrios tópicos e lesões do grupo Endometriose.

EDT (n=26)	Endometrio			Lesão			Idade
	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL	
Valor Mínimo	2,0	0,0	1,0	3	0,0	1,5	21,0
Percentil 25	3,0	0,0	1,5	4	0,0	2,0	29,8
Valor Mediano	6,0	0,0	3,0	8	0,0	4,0	35,0
Percentil 75	12,0	0,0	6,0	12	0,0	6,0	39,3
Valor Máximo	12,0	6,0	9,0	12	1,0	6,5	46,0
Valor Médio	7,0	0,4	3,7	7,6	0,1	3,8	34,7
Desvio Padrão	4,1	1,2	2,3	3,7	0,3	1,9	6,3
<i>p</i>	< 0.0001			< 0.0001			

IRS Final, média entre o IRS Epitelial e IRS Estromal.

A avaliação imunohistoquímica mostrou, portanto, que HLA-G está diferencialmente expresso no epitélio glandular, comparativamente ao estroma, seja no endométrio típico do grupo CTRL (Tabela 5), no endométrio típico do grupo EDT ($p < 0.0001$) ou no tecido glandular das lesões de endometriose ($p < 0.0001$) (Tabela 6).

Figura 10. Exemplos representativos das marcações imunohistoquímicas da proteína HLA-G usando o anticorpo monoclonal 4H84 em tecidos de endométrio e em lesões de endometriose. A. Tecido endometrial; B. Lesão de endometriose retossigmóide; C. Lesão de endometriose retrocervical; D. Controle negativo em lesão de retossigmóide. Objetiva 40 x.

Tomando-se como referência a expressão de HLA-G no endométrio do grupo CTRL, as comparações apontam para uma maior expressão de HLA-G nos tecidos de lesão de EDT e uma semelhança na expressão nos endométrios dos grupos CTRL e EDT (Tabela 7).

Tabela 7. Score de Imunorreatividade (IRS) da proteína HLA-G no endométrio e nas lesões de endometriose de acordo com os estádios da endometriose.

		<i>n</i>	IRS Glandular	IRS Estromal	IRS Final	<i>p</i> ^a
CTRL	Endométrio	22	4 (1-12)	0 (0-0)	2,0 (0,5-6,0)	
I/II^b	Endométrio	12	4 (2-12)	0 (0-1)	2,0 (1,0-6,5)	0,797
	Lesão EDT	12	6 (3-12)	0 (0-1)	3,25 (1,5-6,0)	0,338
III/IV^c	Endométrio	14	8 (2-12)	0 (0-6)	4,0 (1,0-9,0)	0,084
	Lesão EDT	14	8 (3-12)	0 (0-1)	4,0 (1,5-6,5)	0,017
Total	Endométrio	26	6 (2-12)	0 (0-6)	3,0 (1,0-9,0)	0,207
	Lesão EDT	26	8 (3-12)	0 (0-1)	4,0 (1,5-6,5)	0,037

^a valores *p* relativos às comparações com Endométrio do grupo controle (CTRL) nas avaliações dos valores de IRS Final. Valores de IRS representados por mediana (min-max). Teste estatístico Mann-Whitney.

^b Amostras de pacientes com endometriose em estádios iniciais (I/II), apresentando lesões em região retrocervical (*n*=6) e lesões em retossigmóide (*n*=6). *n*, tamanho amostral.

^c Amostras de pacientes com endometriose em estádios avançados (III/IV), apresentando lesões em região retrocervical (*n*=5) e lesões em retossigmóide (*n*=9).

Valores de *p* negritados representam as comparações estatisticamente significativas.

Considerando-se o total de amostras de lesão de EDT na comparação com o endométrio CTRL, a expressão da proteína foi significativamente maior nas lesões (*p*=0,037). Quando segmentadas as lesões de acordo com os estádios da doença, a expressão de HLA-G foi significativamente maior nas lesões de EDT em estádios avançados (III/IV) (*p*=0,017). Já em relação à expressão de HLA-G no endométrio do grupo EDT, não houve diferença em relação ao grupo CTRL, seja considerando o grupo EDT como um todo (*p*=0,207) ou segmentado por estádios iniciais (*p*=0,797) e avançados (*p*=0,084).

A avaliação imunohistoquímica, segundo as fases do ciclo menstrual, não apontou diferença significativa entre as fases, seja no endométrio do grupo

CTRL, endométrio do grupo EDT ou na lesão de EDT, conforme demonstra a Figura 12.

Figura 11. Score de imunoreatividade (IRS) Final na avaliação imunohistoquímica da proteína HLA-G de acordo com as fases do ciclo menstrual. IRS Final nos tecidos de endométrio e lesão de endometriose nos grupos Controle (CTRL) e Endometriose (EDT); M, menstrual; P, proliferativa; S, secretora. Teste estatístico de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn*, n/s, não significativo ($p>0,05$).

Dentre as mulheres cujos tecidos foram submetidos à avaliação imunohistoquímica, 22 das 26 mulheres do grupo EDT e 16 das 22 mulheres do grupo CTRL tiveram também realizada a avaliação da proteína HLA-G solúvel no soro e no fluido peritoneal e estão discriminadas Anexo X.a e X.b (vide Notas). Deste modo, foi possível realizar análises de correlação entre a

expressão da proteína nos tecidos (endométrio e lesão) e a concentração da proteína solúvel (soro e FP) em ambos os grupos.

A análise entre a concentração de sHLA-G no soro e o IRS final no endométrio não resultou em correlação, seja no grupo controle ($r=0,007$; $p=0,980$) ou no grupo EDT ($r= -0,213$; $p=0,342$). A análise considerando a concentração de sHLA-G no FP também não resultou em correlação com a expressão de HLA-G no endométrio, tanto no grupo CTRL ($r= -0,015$; $p=0,957$), como no EDT ($r=0,082$; $p=0,716$) (gráficos não mostrados).

A análise considerando a expressão no tecido de lesão de EDT resultou em correlação negativa com a concentração de sHLA-G no soro ($r= -0,456$; $p=0,033$), embora o coeficiente r tenha indicado apenas uma fraca correlação ($r < 0,8$). Já a análise considerando o FP, não resultou em correlação com a expressão de HLA-G na lesão de EDT ($r= -0,036$; $p=0,874$) (gráficos não mostrados).

7. DISCUSSÃO

Os resultados descritos mostraram que a expressão de HLA-G é maior nas mulheres com endometriose avançada. A concentração de HLA-G solúvel no sangue periférico de mulheres com endometriose avançada, mas não com endometriose inicial, se mostrou maior do que em mulheres sem a doença. Mais ainda, dentre as mulheres cujas concentrações séricas de HLA-G se mostraram mais elevadas— aquelas com endometrioma (EOMA), ou com endometrioma e doença profunda concomitante (EOMA/PFD)— 96% delas apresentavam endometriose nos estádios avançados. De forma semelhante, a expressão da proteína HLA-G nas lesões de endometriose profunda foi significativamente maior nas lesões de endometriose avançada, mas não nas lesões de endometriose inicial. Portanto, os achados deste estudo indicam que a expressão de HLA-G em endometriose estaria relacionada à progressão da doença.

Interessante notar que o transcrito gênico de HLA-G esteve mais expresso no endométrio das mulheres saudáveis, mas a expressão da proteína se mostrou semelhante entre os endométrios de mulheres com e sem endometriose. Sob este aspecto, vale lembrar que o *primer* utilizado amplificava apenas as isoformas de membrana do mRNA HLA-G. Portanto, seria possível imaginar que formas solúveis intracitoplasmáticas da proteína HLA-G poderiam estar sendo mais expressas no endométrio das mulheres com endometriose, ou ainda que mecanismos pós-transcricionais regulariam a tradução da proteína HLA-G no endométrio das doentes, de modo que a expressão da proteína se assemelharia à encontrada nas células endometriais de mulheres saudáveis. Por outro lado, a maior expressão da proteína HLA-G no epitélio glandular em ambiente ectópico, verificada nas lesões de

endometriose avançada, sugere que fatores presentes no microambiente da doença estimulariam as células endometrióticas a produzir HLA-G.

A este respeito, estudos anteriores investigando a expressão gênica e proteica de HLA-G em endometriose e adenomiose, apresentaram conclusões contraditórias. Barrier et al. (2006b), empregando a técnica de hibridização do RNA *in situ*, identificou a presença de mRNA HLA-G no epitélio glandular de lesões de endometriose peritoneal. Mas, em relação ao endométrio, o transcrito gênico não foi detectado em mulheres com ou sem endometriose. Por imunohistoquímica, os pesquisadores avaliaram, ainda, a presença da proteína HLA-G nos mesmos tecidos e, mais uma vez, encontraram a expressão nas lesões de endometriose, mas não nos endométrios de mulheres com ou sem endometriose. Wang et al. (2008), por sua vez, avaliando HLA-G em mulheres com e sem adenomiose, identificaram a presença da proteína no endométrio das doentes e nas lesões de adenomiose, mas não encontraram HLA-G no endométrio das mulheres sem a doença. Em resumo, de acordo com Barrier et al., a inflamação ou o estresse celular na cavidade peritoneal estimulariam os mecanismos promotores da expressão ectópica de HLA-G. Contrariamente, os dados de Wang et al., sugerem que o endométrio típico das doentes já apresentaria um fenótipo diferenciado; e que a inflamação ou o estresse celular, ainda em ambiente típico, induziriam a expressão de HLA-G.

Segundo postulado na hipótese deste estudo, a expressão diferencial de HLA-G nas lesões de endometriose poderia ser sugestiva, também, de uma maior expressão da proteína na forma solúvel, no microambiente da doença. Entretanto, embora a proteína solúvel tenha sido detectada em maiores níveis no soro das mulheres com endometriose avançada, o FP das mulheres com

endometriose não apresentou níveis de HLA-G significativamente superiores aos encontrados no FP de mulheres sem a doença, seja nas doentes em estágio inicial ou avançado. Neste caso, admitindo-se que as lesões de endometriose secretem HLA-G solúvel para o FP, uma possível explicação seria a captação da proteína solúvel, devido à maior quantidade de células imunes presentes no FP das doentes. As células imunes são capazes de sequestrar HLA-G solúvel do FP através da ligação a receptores inibitórios em suas superfícies. Estudos anteriores já mostraram que não apenas a quantidade de células imunes presentes no FP de mulheres com endometriose é maior (Oosterlynck et al., 1994; Tariverdian et al., 2009; Osuga et al., 2011), mas também que a capacidade fagocitária (Braun, et al., 1992) ou citotóxica (Steele, et al., 1984; Oosterlynck, et al., 1991, Oosterlynck, et al., 1992) destas células está diminuída, o que poderia ser, em parte, explicado pela interação com a proteína HLA-G solúvel sequestrada do FP.

Segundo a análise de correlação entre soro e FP, o presente estudo mostrou que os níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) no soro seriam independentes dos níveis no FP, em ambos os grupos de mulheres. Entretanto, nas mulheres com endometriose avançada, níveis séricos mais elevados de HLA-G foram observados, sem que tenha havido um correspondente aumento no FP. Além da provável ligação de formas solúveis de HLA-G às células imunes do FP, seria possível sugerir, também, que, na endometriose, a maior presença de formas solúveis de HLA-G no sangue periférico tenha outra origem associada, que não a produção e secreção pelas células endometriais ectópicas. Neste sentido, seria possível considerar que a secreção de HLA-G para o sangue periférico tenha sido induzida fora do ambiente da endometriose; citocinas geradas no microambiente

da endometriose, uma vez passadas à circulação sistêmica, poderiam induzir células do sistema imune a produzir e secretar HLA-G.

À luz dos presentes achados, há de se levar em consideração, portanto, os fatores existentes no microambiente da endometriose que poderiam ter induzido a expressão de HLA-G nas células endometrióticas, ou talvez também em células imunológicas, e que justificariam a maior expressão de HLA-G verificada na superfície das glândulas endometrióticas e no soro das doentes em fase avançada. Os padrões de citocinas presentes no fluido peritoneal e no sangue periférico de mulheres com endometriose já foram investigados e níveis mais elevados de determinadas citocinas capazes de induzir a expressão de HLA-G foram identificados em ambos.

Sabe-se que IL-10, IFN- β e IFN- γ são capazes de induzir, *in vitro*, a expressão de HLA-G em células trofoblásticas (Moreau et al., 1999; Gregori et al., 2015), monocitárias (Yang Y et al., 1996; Wiendl et al., 2002; Rebmann et al., 2003; Mitsdoerffer et al., 2005) ou tumorais (Ibrahim et al., 2001; Morandi et al., 2007). Em endometriose, IL-10 e IFN- γ na forma solúvel foram detectadas em maiores concentrações, tanto no FP (Tabibzadeh et al., 2003; Monsanto et al., 2015) como no sangue periférico (Suen et al., 2014; Malutan et al., 2015a; Malutan et al., 2015b) das doentes. A percentagem de linfócitos que expressavam IL-10 e IFN- γ foi maior nas mulheres com endometriose em comparação às mulheres saudáveis, tanto em relação aos linfócitos periféricos, como aos do endométrio e das lesões de endometriose (Antsiferova et al., 2005).

Segundo observaram Tabibzadeh e colaboradores (2003), a presença de IL-10 solúvel no FP de mulheres com endometriose se mostrou aumentada

em relação ao FP de mulheres sem a doença, mas apenas naquelas em estádios avançados. Já a concentração de IFN- γ solúvel no FP se mostrou mais elevada nas mulheres com endometriose e se manteve semelhante entre os estádios iniciais e avançados da doença (Monsanto et al., 2015). Além disto, segundo Monsanto et al., (2015) existiria uma correlação positiva entre FP e soro no que diz respeito às concentrações das citocinas em endometriose, sugerindo que as lesões ectópicas seriam o principal fator causador da inflamação sistêmica.

Por conseguinte, o achado de maior concentração sérica de sHLA-G nas mulheres em estádios avançados poderia ser resultado da indução por citocinas geradas no ambiente das lesões de endometriose. Uma possibilidade seria a síntese local de HLA-G, induzida por citocinas como IL-10 ou IFN- γ , que estimulariam células endometrióticas ou células do sistema imune no microambiente da doença a produzir e secretar HLA-G para o sangue periférico. Outra possibilidade seria a indução sistêmica, por meio das citocinas que passariam do local da doença à circulação e, deste modo, induziriam diretamente células monocitárias ou outras células do sistema imune a produzir e secretar HLA-G para o sangue periférico.

Recentemente, foi demonstrado, *in vitro*, que monócitos constituem a principal fonte secretora da proteína HLA-G5 após indução por IL-10 e que linfócitos T CD4, T CD8 e B também são capazes de produzir HLA-G5, embora em quantidades muito menores, acrescentando-se IFN- γ ao meio (Rebmann et al., 2003). Outro experimento *in vitro*, utilizando monócitos do sangue periférico de pacientes com neuroblastoma, mostrou que estas células secretavam sHLA-G em resposta à ativação por citocinas derivadas das células tumorais

(Morandi et al., 2007). Sabe-se também que células dendríticas DC-10 também seriam capazes de secretar HLA-G (vide item 1.3.3). Estudo recente observou que a elevada concentração de sHLA-G no plasma de pacientes com tumor gástrico estava associada ao maior percentual de células DC-10 presentes no sangue periférico destes doentes, em comparação a indivíduos saudáveis (Xu et al., 2016).

Baseado nos exemplos acima seria possível supor que citocinas derivadas do microambiente da doença induziriam a secreção sistêmica de HLA-G, especificamente nas mulheres com endometrioma associado, casos em que as concentrações séricas de HLA-G se mostraram mais elevadas. Tal sugestão decorre de achados anteriores, que revelaram níveis mais elevados de IL-10 no FP das mulheres com endometrioma, comparadas às mulheres que apresentavam endometriose em outros sítios ou comparadas às mulheres saudáveis de Podgaec et al. (2010). Estudo anterior de Podgaec et al. (2007) já havia mostrado que o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias em endometriose possui um perfil de resposta imune predominantemente de padrão Th2, observado tanto no soro como no FP das doentes.

Tais observações corroboram com a hipótese aqui sugerida, de que o perfil de citocinas em endometriose, tanto sistêmico como local, favoreceria a indução da síntese de HLA-G e, por conseguinte, uma resposta imunossupressora, onde além da diminuição da citotoxicidade e indução à apoptose de células imunes, a diferenciação de células imunorreguladoras também seria estimulada.

Com relação ao papel imunomodulador de HLA-G, foi observado que o FP possui uma concentração de sHLA-G muito superior à do soro, mesmo nas

mulheres saudáveis. Além disto, a concentração de sHLA-G no FP não diferiu significativamente entre as mulheres com e sem endometriose. Analisadas em conjunto, tais observações levam à conclusão de que um determinado nível de sHLA-G no FP é normalmente mantido, sugerindo que sHLA-G deva exercer um papel fisiológico relevante na imunorregulação da pelve feminina. Na mesma direção, estudo anterior que avaliou a concentração de sHLA-G no FP de mulheres com dor pélvica, com e sem endometriose, igualmente não encontrou diferença significativa entre as mulheres (Eidukaite e Tamousiunas, 2008).

Outro achado relevante, diz respeito à expressão de HLA-G no endométrio tópico de mulheres saudáveis, independentemente da fase do ciclo menstrual. Kawashima et al. (2009), avaliando também por imunohistoquímica a presença de HLA-G no endométrio de mulheres com e sem endometriose, identificou a proteína apenas na fase menstrual, em ambos os grupos. Tal observação levou os pesquisadores a concluir que a expressão de HLA-G no endométrio é um evento fisiológico durante a fase menstrual, reflexo do estresse do microambiente intrauterino nesta fase. Mais ainda, atribuíram às células endometriais advindas da menstruação retrógrada, a origem da proteína HLA-G solúvel identificada por Eidukaite e Tamousiunas (2008) no fluido peritoneal. De fato, foi apenas na fase menstrual que a expressão de sHLA-G no FP se mostrou mais elevada ($p=0,031$, Tab.3) nas mulheres com endometriose, provavelmente devido ao elevado volume de menstruação retrógrada nestas mulheres (Halme et al., 1984).

Complementando as conclusões de Kawashima et al. (2009), a expressão de HLA-G no endométrio tópico em outras fases do ciclo menstrual

indicaria que os estímulos moduladores da expressão de HLA-G no endométrio estão fisiologicamente ativos mesmo nas fases não inflamatórias que precedem a implantação do embrião. Um possível fator modulador da expressão de HLA-G no endométrio não gravídico seria a progesterona. Sabe-se que as células endometriais expressam receptores de progesterona (PR) ao longo das fases proliferativa e secretora e que a progesterona é capaz de regular diretamente a transcrição do gene HLA-G, via ativação do receptor PR. O complexo P-PR, por sua vez, liga-se ao elemento responsivo à progesterona (PRE) na região promotora do gene HLA-G (Yie et al., 2006).

Por outro lado, em relação às células endometrióticas, a resistência à progesterona já foi bem caracterizada (Bulun, 2009). Portanto, outros mecanismos moduladores presentes no microambiente da endometriose estariam envolvidos no aumento da expressão de HLA-G nas lesões endometrióticas. A este respeito, o estresse oxidativo gerado pela menstruação retrógrada e o contínuo processo inflamatório na cavidade poderiam induzir a expressão de HLA-G nas células endometrióticas, ou ainda, nas células imunes que compõe o microambiente da doença (Maeda et al., 2012)

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da transcrição do gene HLA-G, qualquer que seja o estímulo modulador, não estão completamente elucidados. Tais fatores poderiam promover a transativação, ao invés de agirem diretamente na região promotora do gene HLA-G ou ainda poderiam estar envolvidos na estabilidade do mRNA. Contudo, qualquer que seja o mecanismo de atuação, a eficiência dos moduladores depende de um nível de transcrição basal de HLA-G, fisiologicamente encontrado na quase totalidade dos tecidos humanos, mas que não necessariamente se traduz na

presença da proteína (Brenol et al., 2012). Portanto, fatores de repressão da tradução da proteína HLA-G estariam “desbloqueados” sob condições não fisiológicas, tais como em doenças autoimunes, tumores ou na endometriose. No contexto da endometriose, o estresse gerado no microambiente pélvico poderia ser um reversor da repressão sobre o gene HLA-G.

O estresse oxidativo gerado na endometriose leva à liberação de substâncias intracelulares capazes de se ligar a diferentes receptores em células do sistema imune inato, ativando a resposta inflamatória. Deste modo, um dos mecanismos possíveis para explicar o início do processo inflamatório seria o reconhecimento de DAMPs¹⁰ via *tool-like receptors*-TLR¹¹, uma vez que grande parte das células do fluido menstrual retrógrado são células induzidas à apoptose, devido ao estresse oxidativo gerado pela hipóxia durante o desprendimento do endométrio (Maeda et al., 2012). A cronicidade da inflamação pélvica, por sua vez, se daria pelo estresse oxidativo local resultante da lesão do mesotélio– pela invasão do tecido endometrial, e pela constante tensão mecânica imposta pelas lesões, provocando microtraumas e a ativação contínua de reações inflamatórias, características do sistema lesão-reparo tecidual (Leyendecker et al., 2009; Khan KN et al., 2013).

¹⁰ DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patter*, são moléculas liberadas da matriz extracelular ou do interior da célula, devido a estresse celular, apoptose ou morte celular por fatores não fisiológicos. São moléculas capazes de iniciar ou perpetuar um processo inflamatório estéril, uma vez ligadas a *tool-like receptors* (TLR) na superfície de células do sistema imune inato.

¹¹ *Tool-like receptors* (TLR) são receptores de membrana presentes em células do sistema imune, capazes de reconhecer padrões moleculares de patógenos e/ou autólogos.

Assim sendo, a constante geração de fatores de estresse no local da endometriose seria suficiente para “desbloquear” o silenciamento do gene HLA-G nas células endometrióticas. Além disto, uma vez que o gene HLA-G é ativado e a proteína passa a ser expressa, seja na forma de membrana ou secretada, ela interage com os receptores inibitórios presentes na superfície das células do sistema imune e induz a produção de citocinas imunorreguladoras, retroalimentando, deste modo, a síntese de HLA-G e dos seus receptores.

Em endometriose, vários são os fatores de estresse (DAMPs) passíveis de induzir os genes. Especificamente em relação ao gene HLA-G, um dos marcadores de estresse tecidual buscado em endometriose, a proteína de choque térmico Hsp-70, tem especial relevância, uma vez que a região promotora do gene HLA-G possui um elemento responsivo às proteínas de choque térmico. Estudos mostraram que a proteína Hsp-70 está mais concentrada nos tecidos de endométrio e de lesões em mulheres com endometriose do que nos endométrios de mulheres sem a doença. Além disto, os tecidos de endométrio e de lesão endometriótica apresentaram expressão de HSP-70 muito superiores na fase menstrual, comparada à fase proliferativa ou secretora (Imamura et al., 2014). No presente estudo, foi justamente na fase menstrual que a concentração de sHLA-G se mostrou maior no FP das mulheres com endometriose, corroborando com a hipótese de uma possível indução da síntese de HLA-G por HSP-70 durante esta fase.

Baseado nos resultados deste estudo e nas evidências trazidas para esta discussão seria possível sugerir que a proteína HLA-G integraria a fisiopatologia da endometriose, segundo os mecanismos descritos a seguir.

Em um ciclo menstrual usual de uma mulher saudável, a queda da progesterona sérica induziria a contração da musculatura lisa do útero e das artérias espiraladas, resultando na menstruação; tais contrações induziriam o estresse oxidativo devido à injúria isquêmica e rompimento do tecido endometrial. A invasão transiente de bactérias e a inflamação no útero durante o período menstrual aumentaria a produção de Hsp70 e HLA-G no endométrio, fisiologicamente (Khan KN et al., 2008b; Khan KN et al., 2010, Maeda et al., 2012). Via refluxo pelas tubas, células endometriais apoptóticas (expressoras de Hsp70 e HLA-G), endotoxinas e *debris* celulares atingiriam a cavidade pélvica e reagiriam com células imunocompetentes presentes no fluido peritoneal. No caso de mulheres saudáveis, o conteúdo do refluxo menstrual seria eliminado da cavidade sem que houvesse processo inflamatório (Bruner-Tran et al., 2013). Entretanto, nas mulheres com endometriose, o fenótipo das células endometriais descamadas seria outro, mais parecido com o fenótipo de células da *basalis*, resistentes à apoptose, conferindo-lhes uma vantagem à sobrevivência em ambiente ectópico (Leyendecker et al, 2002). O fluido retrógrado das mulheres com endometriose, além de mais volumoso, apresentaria maior concentração de endotoxinas e Hsp70, o que estimularia a ativação de fagócitos em níveis acima do fisiológico, levando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias que acabariam por favorecer os processos de adesão e invasão das células endometriais viáveis (Kyama et al., 2003; Khan KN et al., 2010). Além disto, a expressão de HLA-G pelas células endometriais “menstruais” resistentes à apoptose favoreceria a inibição de células imunes, permitindo-lhes sobreviver e se implantar. Nesta fase inicial da endometriose, a prevalência de citocinas como IFN- γ poderia favorecer a produção de HLA-G

pelas células endometrióticas. A presença de estrogênios, cujos receptores estão altamente expressos nas células endometrióticas, estimularia o processo de proliferação das células endometrióticas, bem como o sistema lesão-reparo (Leyendecker et al., 2009). A repetição desses fenômenos ciclicamente levaria à cronificação da doença, quando fatores do sistema imune adaptativo já estariam influenciando o microambiente da lesão, através de elevadas concentrações de citocinas de perfil anti-inflamatório, como IL-10, capaz de estimular a produção de HLA-G, tanto nas células endometrióticas implantadas, como nas células do sistema imune das imediações das lesões ou circulantes.

Assim, estes mecanismos explicariam a participação de HLA-G nos processos de implantação e manutenção das células endometriais ectópicas e seriam congruentes com os achados de maior expressão da proteína HLA-G nas fases avançadas da endometriose, tanto nas lesões de endometriose, como no soro das doentes.

Os resultados desta pesquisa indicam, portanto, que a proteína HLA-G participa da fisiopatologia da endometriose. Desde que estudos mais aprimorados venham a ser realizados, os resultados aqui obtidos abrem a possibilidade de se usar a concentração sérica de HLA-G como biomarcador para monitorar a progressão da endometriose, especialmente nas mulheres que apresentam simultaneamente a forma ovariana e profunda da endometriose. Surge daqui, também, a perspectiva de se considerar terapias imunomoduladoras para reversão da imunossupressão induzida por HLA-G e, conseqüentemente, a eliminação das lesões de endometriose.

8. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos é possível concluir que existe um envolvimento da proteína HLA-G na fisiopatologia da endometriose, uma vez que:

1. Sistemicamente, a proteína HLA-G solúvel ocorre em maiores níveis nas mulheres com endometriose nos estádios mais avançados (III ou IV), independentemente da localização da doença. Considerada a localização da endometriose, os níveis sistêmicos são maiores nas mulheres com endometrioma ovariano, associado ou não, à endometriose profunda, nos estádios avançados da doença.
2. Embora a expressão da proteína HLA-G seja semelhante entre os endométrios de mulheres com e sem endometriose, sua expressão é maior nas lesões de endometriose profunda, indicando que a produção da proteína é induzida no microambiente da endometriose.

9. ANEXOS

ANEXO I - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

a. Termo de Consentimento aplicado a pacientes com endometriose.

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

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica.

PESQUISADOR : Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

CARGO/FUNÇÃO: Médico responsável pelo Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do HCFMUSP e
Professor Livre-Docente Associado pelo Depto de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CRM Nº 52842.....

UNIDADE DO HCFMUSP: . Depto Ginecologia e Obstetrícia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☒

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .60 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O objetivo deste estudo é entender qual a causa e compreender os sintomas de uma doença chamada endometriose. Nesta doença, o endométrio, que é a parte do útero que se desprende e sangra durante a menstruação, pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o tecido que reveste o abdômen internamente (chamado de peritônio) e outras localizações como o intestino, bexiga e outros órgãos. As pacientes que apresentam esta doença podem apresentar sintomas como dores abdominais e dificuldades para engravidar. Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças, são desenvolvidas pesquisas para entender melhor por que e como ocorre a doença. Será avaliada a presença de diferentes tipos de células envolvidas em sua resposta imune, bem como verificaremos da presença de proteínas que possam estar envolvidas no aparecimento da doença. Para estas pesquisas, precisamos utilizar amostras de sangue e de tecido endometrial de pacientes com a doença e que, neste estudo, serão comparadas com as amostras de mulheres sem a doença. Por meio desta pesquisa que a senhora está sendo convidada a participar será possível compreender melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer futuramente novas possibilidades de diagnóstico e tratamento para as pacientes com endometriose.

A laparoscopia será realizada nas pacientes que necessitem de confirmação de diagnóstico de endometriose e para seu tratamento cirúrgico, através da retirada dos focos compatíveis com a doença.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

A senhora está sendo admitida neste hospital para um procedimento de laparoscopia. Este procedimento será realizado normalmente para o diagnóstico definitivo e o tratamento de sua doença. Inicialmente, será coletada uma amostra de sangue (20ml) , considerada pequena e sem riscos para sua saúde. O procedimento da coleta será através da veia do braço, utilizando materiais descartáveis e estéreis.

No começo da cirurgia, após a realização da anestesia, será colhido uma amostra do seu endométrio, tecido que reveste a cavidade uterina e que normalmente é eliminado através das menstruações. Esta coleta será feita por uma fina sonda estéril e descartável. Após este procedimento, será feita a laparoscopia e durante este procedimento coletaremos aproximadamente 5 ml de fluido peritoneal (um líquido que normalmente existe no interior de sua cavidade abdominal e que normalmente é descartado durante a laparoscopia). A obtenção destes materiais não causará riscos adicionais no procedimento e também não afetará em aumento do tempo do procedimento. Estes materiais coletados serão identificados por códigos formados por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade não serão reveladas. No estudo experimental será analisada a presença de diferentes tipos de células envolvidas em sua resposta imune, bem como a avaliação da presença diversas proteínas presentes no sangue e no tecido endometrial. Esta células e proteínas

poderiam estar envolvidas em alguma alteração imunológica e favorecer o aparecimento e desenvolvimento da endometriose.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Será realizado procedimento rotineiro da retirada do tecido doente (com endometriose) no abdômen, durante a cirurgia, para análise do tipo de endometriose, fazendo parte do diagnóstico ou tratamento de sua doença.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

A retirada de sangue é muito simples, praticamente não há risco para o paciente, sendo o desconforto apenas a picada no braço, na hora de introduzir a agulha. No local da punção da veia poderá ocorrer pequeno sangramento que podem causar dor, mas não trarão nenhum prejuízo futuro; o fluido peritoneal e o fragmento de tecido endometrial serão retirados sob efeito de anestesia geral sem apresentar riscos adicionais a seu procedimento cirúrgico.

Os efeitos adversos da cirurgia serão aqueles relacionados ao procedimento de laparoscopia: como sonolência e náuseas causadas pela anestesia geral, leve desconforto abdominal e dor, que não estarão elevados em virtude destas coletas adicionais. Todos os efeitos adversos pós-cirúrgicos deverão ser eliminados pela administração de medicamentos específicos (anti-inflamatórios, anti-eméticos, analgésicos e antibióticos) no período pós-cirúrgico.

5 – Benefícios para o participante

É importante ressaltar que não haverá benefício direto para a senhora. Porém, com esta pesquisa buscaremos ajudar as pacientes com endometriose tentando compreender como surge e progride a doença. Trata-se de estudo experimental, onde serão estudadas diversas moléculas (proteínas) e células presentes tanto no tecido endometrial como no sangue e fluido peritoneal, para no futuro, serem possíveis tratamentos mais adequados para a doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Se a senhora não concordar em doar os materiais para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não existem diferenças nos tratamentos realizados em virtude de sua participação ou não neste estudo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o

Dr. Mauricio Simões Abrão, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Eneas de Cravalho Aguiar, 255** Telefone(s) 3069.6647. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica".

Eu discuti com o Dr. **Maurício Simões Abrão** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Autorizo ainda o armazenamento das amostras provenientes da coleta aprovada por este termo de consentimento para uso em pesquisas futuras, segundo resolução no 347, de 13 de janeiro de 2005, do Conselho Nacional de Saúde.

- b. Termo de Consentimento aplicado a pacientes Controles.

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

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica.
- PESQUISADOR : Prof. Dr. Maurício Simões Abrão
- CARGO/FUNÇÃO: Médico responsável pelo Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do HCFMUSP
e Professor Livre-Docente Associado pelo Depto de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CRM Nº 52842
- UNIDADE DO HCFMUSP: Depto Ginecologia e Obstetrícia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☒ X
- RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .60 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O objetivo deste estudo é entender qual a causa e compreender os sintomas de uma doença chamada endometriose. Nesta doença, o endométrio, que é a parte do útero que se desprende e sangra durante a menstruação, pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o tecido que reveste o abdômen internamente (chamado de peritônio) e outras localizações como o intestino, bexiga e outros órgãos. As pacientes que apresentam esta doença apresentam sintomas como dor abdominal e dificuldades para engravidar. Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Para entender por que e como ocorre a doença, precisamos comparar as amostras das pacientes com endometriose com as amostras de pacientes saudáveis sem endometriose. Ou seja, para compreender a doença, precisamos compreender primeiro como o tecido normal se comporta. Por meio desta pesquisa que a senhora está sendo convidada a participar será possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento para as pacientes com endometriose.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

A senhora está sendo admitida neste hospital para um procedimento cirúrgico (laqueadura das tubas uterinas). A sua cirurgia será realizada normalmente, sem nenhuma modificação.

Inicialmente, será coletada uma amostra de sangue (20ml) , considerada pequena e sem riscos para sua saúde. O procedimento da coleta será através da veia do braço, utilizando materiais descartáveis e estéreis.

No começo da cirurgia, após a realização da anestesia, será colhida uma amostra do seu endométrio, tecido que reveste a cavidade uterina e que normalmente é eliminado através das menstruações. Esta coleta será feita por uma fina sonda estéril e descartável. Após este procedimento, será feita a laparoscopia e durante este procedimento coletaremos aproximadamente 5 ml de fluido peritoneal (um líquido que normalmente existe no interior de sua cavidade abdominal e que normalmente é descartado durante a laparoscopia). A obtenção destes materiais não causará riscos adicionais no procedimento e também não afetará em aumento do tempo do procedimento. Estes materiais coletados serão identificados por códigos formados por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade não serão reveladas. No estudo experimental será analisada a presença de diferentes tipos de células envolvidas em sua resposta imune, bem como a verificação da presença diversas proteínas presentes no seu sangue e no seu tecido endometrial. Estas células e proteínas poderiam estar envolvidas em alguma alteração imunológica e favorecer o aparecimento e desenvolvimento da endometriose.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Será realizado procedimento rotineiro da laqueadura das tubas uterinas por laparoscopia. Este procedimento será feito com a cauterização das tubas uterinas com corte e interrupção daquele segmento das tubas.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Os desconfortos estão relacionados com o procedimento cirúrgico que a senhora irá se submeter, e a participação neste estudo não apresenta nenhum risco adicional..

A retirada de sangue é muito simples, praticamente não há risco para o paciente, sendo o desconforto apenas a picada no braço, na hora de introduzir a agulha. No local da punção da veia poderá ocorrer pequeno sangramento que pode causar dor, mas não trará nenhum prejuízo futuro.

O fluido peritoneal e o fragmento do endométrio serão retirados com a senhora sob efeito de anestesia peridural.

Os riscos esperados para a coleta do fragmento do útero são mínimos. Em número pequeno de pacientes pode ocorrer algum corrimento escuro, como no final da menstruação, que tende a desaparecer no máximo até um dia após o procedimento.

Os efeitos adversos da cirurgia serão aqueles relacionados ao procedimento de laqueadura tubária, como sonolência e náuseas causadas pela anestesia peridural, leve desconforto abdominal e dor. Todos os efeitos adversos pós-cirúrgicos serão eliminados pela administração de medicamentos específicos (anti-inflamatórios, anti-eméticos, analgésicos e antibióticos) no período pós-cirúrgico.

5 – Benefícios para o participante

É importante ressaltar que não haverá benefício direto para a senhora. Porém, com esta pesquisa buscaremos ajudar as pacientes com endometriose tentando compreender como surge e progride a doença. Trata-se de estudo experimental, onde serão estudadas diversas moléculas (proteínas) e células presentes tanto no tecido como no sangue e fluido peritoneal, para num futuro, serem possíveis tratamentos mais adequados para a doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Se a senhora não concordar em doar os materiais para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não existem diferenças nos tratamentos realizados em virtude de sua participação ou não neste estudo.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Maurício Simões Abrão, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Eneas de Cravalho Aguiar, 255** Telefone(s) 3069.6647. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica".

Eu discuti com o Dr. *Maurício Simões Abrão* sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Autorizo ainda o armazenamento das amostras provenientes da coleta aprovada por este termo de consentimento para uso em pesquisas futuras, segundo resolução No 347, de 13 de janeiro de 2005, do Conselho Nacional de Saúde.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo _____ Data ____ / ____ / ____

ANEXO II – Projeto de Mestrado: Aprovações do Comitê de Ética.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 04.06.14 a execução do subprojeto intitulado **"Papel do HLA-G na Endometriose"**, que será dissertação de mestrado da aluna **Marici Rached Rached**, tendo como orientador o Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0386/11**, intitulado **"Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica"**, aprovado por esta CAPPesq em 13.07.2011.

CAPPesq, 04 de Junho de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur

Coordenador

**Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq**

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0386/11

Título: Endometriose: Bases Moleculares da Resposta Imunológica

Pesquisador Responsável: Mauricio Simões Abrão

Pesquisador Executante: Mauricio Simões Abrão

Disciplina: Ginecologia

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 04/06/2014, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 21/05/2014 - Comunicado que o Subprojeto intitulado "Papel do HLA-G na Endometriose" será dissertação de mestrado da aluna Marici Rached Rached.

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

CAPPesq, 04 de Junho de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO III – Banco de Tecidos e Fluidos Corporais: Aprovação do Comitê de Ética.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/09/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0505/07**, intitulado: **"BANCO DE TECIDOS E FLUIDOS CORPORAIS DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE"** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Maurício Simões Abrão**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. Sérgio Podgaec**

Dr. João Antonio Dias Junior.

CAPPesq, 26 de Setembro de 2007

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069

6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

metc

ANEXO IV – Relatório Cirúrgico.

(Etiqueta)					Equipe:	
Nome:					Cirurgia Realizada:	
Data:	Estadio:	Ciclo:	Endométrio:	Histero:	Exame Físico-Toque:	
			() Normal	() Não	() Normal	
AP:	CA125:	DUM:	() Pólipo	() Cirúrgica	() Nódulo retrocervical/sigmoide	
Mirena: () Sim / () Não			() Espessamento	() Diagnóstica./NL	() Outros	
Lesão		Não	Sim	Especificações		Diâmetro
Lado (Esq/Dire)						
Aderências						
Bloqueio de Fundo de saco						
Peritônio				Bexiga		
				Ureter (aderido/extrínseco)		
				Outros (especificar)		
Ovário direito				Superficial		
				Endometrioma		
				Outro Cisto		
Ovário esquerdo				Superficial		
				Endometrioma		
				Outro Cisto		
Bexiga (Muscular)						
Ureter (Infiltrado/ Intrínseco)						
Hidronefrose						
Retrocervical (LUS)						
Septo:						
Vagina (Muscular)						
Retossigmoide						
Delgado						
Apêndice						
Tubas				Lesão Serosa Leve		
				Lesão Serosa Moderada / Moderada Imobilidade		
				Imobilidade Severa		
				Obstrução Completa		
Para-retal						
Ligamento redondo						
Outros						
- EDT parede						
- Miomas						
- Adenomiase						
- Outros						
Cromotubagem				Positiva à esquerda	Negativa à esquerda	
				Positiva à direita	Negativa à direita	
Ressecção de todos focos visíveis: () sim / () não						
Complicações:						

NOME DA PACIENTE
(ETIQUETA)

Estadio I (1 - 5 pontos) _____

Estadio II (6-15 pontos) _____

Estadio III (13-40 pontos) _____

Estadio IV (> 40 pontos) _____

Percentual de Lesões Vermelhas: _____%

Percentual de Lesões Negras: _____%

Percentual de Lesões Brancas: _____%

ENDOMETRIOSE			< 1 cm	1 - 3 cm	> 3 cm
Peritônio		SUPERFICIAL	1	2	4
		PROFUNDA	2	4	6
OVÁRIO	D	SUPERFICIAL	1	2	4
		PROFUNDA	4	16	20
	E	SUPERFICIAL	1	2	4
		PROFUNDA	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR		PARCIAL	COMPLETA		
		4	40		
ADERÊNCIAS			< 1/3 Envolvido	1/3 - 2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
OVÁRIO	D	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4	8	16
	E	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4	8	16
TROMPA	D	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4*	8*	16
	E	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4*	8*	16

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

Endometriose Adicional : _____

Patologias Associadas : _____

ANEXO V – Formulário de estadiamento da ASRM.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40 Prognosis _____
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION	Partial		Complete	
	4		40	
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
TUBE	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Denote appearance of superficial implant types as red [(R), red, red-pink, flamelike, vesicular blobs, clear vesicles], white [(W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown], or black [(B) black, hemosiderin deposits, blue]. Denote percent of total described as R____%, W____% and B____%. Total should equal 100%.

Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____

ANEXO VI – Concentrações de sHLA-G no soro e fluido peritoneal e Dados clínicos das pacientes.

a. Concentrações (U/ml) de sHLA-G no soro e fluido peritoneal e dados clínicos do grupo Controle.

Grupo Controle		Concentração sHLA-G (U/ml)		Dados Clínicos		Grupo Controle		Concentração sHLA-G (U/ml)		Dados Clínicos	
Identificação da Paciente	Soro	Fluido Peritoneal	Fase Hormonal	Idade (anos)		Identificação da Paciente	Soro	Fluido Peritoneal	Fase Hormonal	Idade (anos)	
C 01	0,00	23,46	M	26		C 36	19,13	16,32	S	34	
C 02	6,18	26,90	M	28		C 37	27,89	27,36	S	34	
C 03	1,22	65,56	M	36		C 38	5,68	32,62	S	29	
C 04	12,17	42,10	M	28		C 39	13,43	32,25	S	37	
C 05	5,89	46,87	P	30		C 40	3,05	20,27	S	31	
C 06	5,46	35,12	P	28		C 41	9,70	40,67	S	52	
C 07	5,72	20,23	P	34		C 42	0,95	28,62	S	37	
C 08	5,76	32,10	P	31		C 43	8,60	80,46	S	34	
C 09	5,38	7,73	P	39		C 44	36,87	48,68	S	44	
C 10	4,99	56,20	P	35		C 45	6,15	15,11	S	24	
C 11	7,33	6,36	P	29		C 46	30,61	27,17	S	25	
C 12	33,84	9,24	P	25		C 47	5,63	53,31	S	42	
C 13	13,84	10,85	P	35		C 48	5,17	22,00	S	43	
C 14	0,21	11,47	P	47		C 49	6,06	26,87	S	33	
C 15	31,80	27,99	P	45		C 50	0,00	26,69	S	29	
C 16	4,98	63,59	P	46		C 51	5,44	52,93	S	37	
C 17	1,75	16,51	P	30		C 52	7,00	65,91	S	32	
C 18	11,85	33,26	P	32		C 53	1,81	52,74	S	42	
C 19	19,91	17,96	P	30		C 54	1,22	24,93	S	24	
C 20	10,34	17,33	P	31		C 55	1,35	19,10	S	39	
C 21	24,68	53,10	P	35		C 56	20,81	32,74	S	38	
C 22	7,24	56,84	P	43		C 57	1,81	18,33	S	40	
C 23	3,30	40,61	P	32		C 58	8,71	55,84	S	32	
C 24	4,30	50,61	P	47		C 59	7,61	10,48	S	36	
C 25	1,67	34,23	P	33		C 60	2,17	3,74	S	33	
C 26	4,64	18,14	P	35		C 61	10,61	39,50	S	30	
C 27	4,13	61,56	P	38		C 62	4,22	17,75	NR	42	
C 28	21,39	82,66	P	26		C 63	1,50	58,84	NR	53	
C 29	5,16	24,61	P	34		C 64	6,58	70,74	NR	21	
C 30	2,84	96,53	P	40		C 65	8,86	41,75	NR	33	
C 31	6,83	5,89	P	32		C 66	8,61	45,94	NR	41	
C 32	0,99	136,4	P	40		C 67	4,06	32,70	NR	32	
C 33	12,31	100,93	S	33		C 68	4,24	16,30	NR	33	
C 34	5,76	39,38	S	29		C 69	4,13	14,15	NR	39	
C 35	10,81	3,29	S	31		C 70	7,76	73,75	NR	44	

b. Concentração (U/ml) de sHLA-G no soro e fluido peritoneal, dados clínicos e cirúrgicos do grupo Endometriose.

Grupo EDT	Concentração sHLA-G (U/ml)			Dados Clínicos e Cirúrgicos					Grupo EDT	Concentração sHLA-G (U/ml)			Dados Clínicos e Cirúrgicos					
	Identifi- cação	Soro	FP	Tipos de EDT		Fase	Idade	Identifi- cação		Soro	FP	Tipos de EDT		Fase	Idade			
				SUP	EOMA	PFD	Estádio		Horizontal	(anos)				SUP	EOMA	PFD	Estádio	Horizontal
P 01	1,83	31,92			X		2	N/R	28	P 67	8,00	34,09	X			2	P	30
P 02	36,60	56,41		X	X		2	S	47	P 68	2,16	18,28	X		X	3	S	37
P 03	16,25	24,47		X			4	S	45	P 69	3,01	33,56			X	2	S	39
P 04	11,97	27,91		X	X		3	P	27	P 70	33,72	4,88		X	X	3	S	29
P 05	1,46	12,42			X		2	S	30	P 71	11,42	25,95		X	X	4	S	33
P 06	2,44	6,79	X				1	P	45	P 72	3,88	41,90			X	2	S	29
P 07	29,64	54,65		X	X		4	S	32	P 73	15,76	5,84			X	1	P	32
P 08	65,33	46,17	X				1	S	43	P 74	3,20	15,45		X	X	4	S	30
P 09	4,04	32,80		X	X		4	S	47	P 75	54,43	63,38			X	2	P	35
P 10	0,00	27,99		X	X		4	S	36	P 76	3,08	27,22		X	X	4	S	26
P 11	4,76	12,16		X			3	S	29	P 77	81,52	89,27		X		3	P	35
P 12	0,00	15,72		X	X		3	P	35	P 78	16,01	24,36			X	3	S	35
P 13	47,67	46,90		X	X		3	S	35	P 79	3,23	9,20			X	1	S	34
P 14	70,40	14,70					2	P	32	P 80	14,75	34,82		X	X	2	S	32
P 15	0,54	10,01		X	X		3	N/R	30	P 81	37,15	21,90		X	X	4	P	29
P 16	121,44	15,80			X		4	S	49	P 82	13,51	71,78			X	4	P	35
P 17	67,66	48,25		X	X		3	S	32	P 83	11,10	76,93		X	X	4	S	33
P 18	0,85	19,33			X		3	P	31	P 84	9,74	23,23		X	X	4	P	38
P 19	12,03	11,09		X			4	S	31	P 85	17,00	29,32		X	X	3	P	31
P 20	28,44	33,06		X			3	S	21	P 86	3,88	7,40		X	X	3	S	34
P 21	8,54	13,02	X		X		2	S	32	P 87	7,37	10,06	X		X	2	P	30
P 22	23,71	36,00	X	X	X		4	S	31	P 88	6,26	5,64			X	1	P	34
P 23	4,23	50,91		X	X		4	S	34	P 89	21,68	124,07		X	X	4	S	38
P 24	21,78	23,16		X	X		4	S	31	P 90	5,72	17,43			X	1	S	45
P 25	37,61	37,89	X				1	P	27	P 91	8,45	14,85			X	4	S	38
P 26	4,78	42,13	X		X		3	S	26	P 92	5,33	21,83			X	1	P	44
P 27	5,83	6,10			X		2	S	34	P 93	31,78	208,21		X		2	M	35
P 28	4,53	24,00		X	X		4	P	38	P 94	3,31	39,29			X	2	S	35
P 29	4,65	93,64			X		2	P	38	P 95	7,41	5,96			X	3	S	32
P 30	2,61	152,99		X			4	S	34	P 96	1,23	70,44		X	X	3	S	25
P 31	32,40	21,67			X		4	S	35	P 97	1,69	7,56			X	2	S	30
P 32	83,36	27,50	X				1	P	30	P 98	13,27	42,05			X	4	S	37
P 33	47,62	33,76		X	X		3	S	35	P 99	5,18	27,80			X	4	S	38
P 34	3,79	174,72			X		4	S	32	P 100	5,89	63,57		X		3	S	37
P 35	18,20	24,28		X	X		3	N/R	32	P 101	7,41	25,54			X	3	S	34
P 36	39,32	40,71		X	X		4	P	37	P 102	20,13	30,14			X	2	S	35
P 37	30,57	115,50			X		3	P	38	P 103	4,01	108,24	X			1	S	27
P 38	6,55	20,87	X				1	S	31	P 104	6,06	77,19			X	2	P	27
P 39	5,86	39,60			X		2	S	28	P 105	9,26	100,70			X	4	S	45
P 40	7,72	19,05		X	X		4	S	37	P 106	3,98	5,63			X	2	P	38
P 41	4,48	10,12		X	X		4	S	37	P 107	4,32	9,47	X		X	4	S	43
P 42	3,42	60,23			X		4	P	45	P 108	4,07	254,74			X	2	M	34
P 43	49,03	34,54	X				1	S	30	P 109	4,47	16,71	X			1	S	43
P 44	5,35	9,60			X		4	S	27	P 110	9,60	24,96			X	3	S	36
P 45	5,45	19,30			X		4	S	30	P 111	140,44	114,88			X	2	S	38
P 46	4,56	20,76			X		2	S	36	P 112	1,15	19,10			X	4	P	43
P 47	3,77	34,36	X				1	S	36	P 113	53,11	64,28	X	X		3	P	40
P 48	21,64	20,26	X	X	X		3	S	28	P 114	1,15	9,50	X		X	2	S	40
P 49	2,13	30,56		X	X		4	N/R	21	P 115	11,09	102,62		X	X	4	P	32
P 50	3,00	8,91			X		2	S	41	P 116	1,15	23,09	X			2	S	41
P 51	3,90	11,19	X				1	N/R	35	P 117	72,64	42,88			X	2	P	38
P 52	4,48	67,39		X	X		4	S	39	P 118	1,22	47,38			X	2	S	35
P 53	3,17	35,22			X		2	P	41	P 119	2,81	33,50			X	4	S	35
P 54	8,86	174,43		X	X		4	S	37	P 120	3,41	137,51			X	4	M	40
P 55	17,96	12,39		X	X		4	S	33	P 121	8,98	15,98			X	2	S	38
P 56	29,89	11,00		X	X		4	P	49	P 122	2,62	50,19			X	4	S	33
P 57	7,67	74,98			X		4	S	29	P 123	4,82	42,25	X			2	P	33
P 58	3,29	4,02			X		2	S	36	P 124	79,29	119,31	X		X	2	M	41
P 59	15,37	210,84	X				1	P	39	P 125	10,04	14,04	X			2	P	42
P 60	27,77	31,69			X		4	S	25	P 126	3,84	27,31		X	X	4	S	33
P 61	23,60	27,68		X	X		3	S	33	P 127	3,73	130,78	X		X	3	P	46
P 62	1,50	49,62			X		2	P	35	P 128	47,37	68,15	X		X	4	S	21
P 63	3,77	16,22			X		1	M	39	P 129	3,51	20,97	X		X	2	S	26
P 64	1,57	20,91	X				1	S	29	P 130	4,73	27,55		X	X	4	S	32
P 65	28,24	26,34			X		4	S	39	P 131	8,44	39,60	X		X	2	S	37
P 66	3,00	51,67	X	X	X		4	P	44	P 132	4,02	33,33		X	X	4	S	42

Nota: EDT, endometriose; SUP, endometriose superficial; EOMA, endometrioma ovariano; PFD, endometriose profunda; M, menstrual; P, proliferativa; S, secretora; N/R, não referida.

ANEXO VII – Avaliação estatística das concentrações de sHLA-G de acordo com o estágio e tipo da endometriose.

a. Comparações das concentrações (U/ml) de sHLA-G no soro e fluido peritoneal entre o grupo Controle e os sub-grupos de Endometriose, segmentados de acordo com os estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da doença.

SORO			
	CTRL	EDT I/II	EDT III/IV
<i>n</i>	70	55	77
Valor Mínimo	0,0	1,2	0,0
Percentil 25	3,9	3,3	3,9
Valor Mediano	5,8	5,3	8,5
Percentil 75	10,4	15,4	22,7
Valor Máximo	36,9	140,4	121,4
<i>p</i>		0,893	0,050

FLUIDO PERITONEAL			
	CTRL	EDT I/II	EDT III/IV
<i>n</i>	70	55	77
Valor Mínimo	3,29	4,02	4,88
Percentil 25	18,1	13,02	19,32
Valor Mediano	32,4	30,1	27,9
Percentil 75	53,0	42,9	57,4
Valor Máximo	136,4	254,7	174,7
<i>p</i>		0,326	0,794

Nota: Valores de *p* representam a significância nas comparações entre o grupo Controle (CTRL) e um dos sub-grupos de Endometriose (EDT) – EDT I/II ou EDT III/IV; *n*, número amostral; teste estatístico, *Mann Whitney*.

b. Comparações das concentrações (U/ml) de sHLA-G no soro e fluido peritoneal entre o grupo Controle e os subgrupos de Endometriose, segmentados de acordo com o tipo da doença.

SORO					
	CTRL	SUP	EOMA	PFD	EOMA/PFD
<i>n</i>	70	15	9	66	42
Valor Mínimo	0,0	1,6	2,6	0,9	0,0
Percentil 25	3,9	3,9	5,3	3,3	4,0
Valor Mediano	5,8	6,6	12,0	5,3	11,1
Percentil 75	10,4	37,6	40,8	13,3	23,6
Valor Máximo	36,9	83,4	81,5	140,4	67,7
<i>p</i>		0,390	0,042	0,931	0,046
FLUIDO PERITONEAL					
	CTRL	SUP	EOMA	PFD	EOMA/PFD
<i>n</i>	70	15	9	66	42
Valor Mínimo	3,3	6,8	11,1	4,0	4,9
Percentil 25	18,1	16,7	18,3	14,8	21,5
Valor Mediano	32,4	34,1	33,1	27,1	28,0
Percentil 75	53,0	42,3	76,8	52,7	48,9
Valor Máximo	136,4	210,8	153,0	254,7	174,4
<i>p</i>		0,813	0,464	0,574	0,871

Nota: Valores de *p* representam a significância nas comparações entre o grupo Controle (CTRL) e um dos subgrupos de Endometriose (EDT) – Superficial (SUP), Endometrioma (EOMA), Profunda (PFD) ou Endometrioma associado à doença Profunda (EOMA/PFD); *n*, número amostral; teste estatístico, *Mann Whitney*.

ANEXO VIII – Avaliação da expressão de mRNA HLA-G e dados clínicos dos grupos Controle e Endometriose.

a. Valores de Ct HLA-G, Ct β -actina e Δ Ct em amostras de endométrio do grupo Controle e dados clínicos.

CTRL	Endométrio			Dados Clínicos	
Identificação	Ct _{HLA-G}	Ct _{β-actina}	Δ Ct	Fase Hormonal	Idade (anos)
C 01	22,6932	20,3228	2,3704	M	26
C 03	26,7521	22,3086	4,4435	M	36
C 08	22,6708	20,9346	1,7362	P	31
C 10	21,8309	20,0166	1,8142	P	35
C 11	24,1183	21,3507	2,7676	P	29
C 13	24,6826	20,4499	4,2327	P	35
C 19	22,6799	19,7427	2,9373	P	30
C 30	24,1673	20,4499	3,7173	P	40
C 31	23,7923	21,4234	2,3689	P	32
C 36	27,2889	20,1854	7,1036	S	34
C 39	24,5599	20,5245	4,0354	S	37
C 48	24,8169	21,0985	3,7184	S	43
C 50	25,8260	22,2710	3,5549	S	29
C 57	25,3923	19,8907	5,5017	S	40
C 58	23,3219	22,7116	0,6102	S	32
C 59	23,3112	19,8996	3,4116	S	36
C 71	22,5739	19,7748	2,7991	P	30
C 73	24,1936	22,1430	2,0506	P	29
C 74	26,3490	22,4841	3,8649	P	25
C 77	22,7599	21,7160	1,0439	NR	32
C 78	24,8819	21,5620	3,3200	P	29
Valor Médio	24,22204	21,01241	3,2096		

Nota: Ct, *Threshold cycle*; valores de Ct correspondentes à média de triplicata. Δ Ct = Ct HLA-G - Ct β -actina; CTRL, grupo Controle; M, menstrual; P, proliferativa, S, secretora; NR, não referida.

b. Valores de Ct HLA-G, Ct β -actina e Δ Ct em amostras de endométrio do grupo endometriose, dados clínicos e cirúrgicos.

Grupo EDT	Endométrio			Dados Clínicos e Cirúrgicos				
Identificação	Ct _{HLA-G}	Ct _{β-actina}	Δ Ct	Tipos de EDT			Fase Hormonal	Idade (anos)
				SUP	EOMA	PFD		
P 26	25,8962	21,2899	4,6064	X		X	3 S	26
P 36	26,5252	23,3401	3,1851		X	X	4 P	37
P 44	24,1969	18,4173	5,7795			X	4 S	27
P 55	23,5693	19,4115	4,1579		X	X	4 S	33
P 57	25,8500	21,4722	4,3778			X	4 S	29
P 60	24,9244	20,5533	4,3712			X	4 S	25
P 98	26,1928	21,7588	4,4340			X	4 S	37
P 99	23,7452	20,5477	3,1975			X	4 S	38
P 121	25,8974	22,0117	3,8857			X	2 S	38
P 132	26,4362	20,1900	6,2461		X	X	4 S	42
P 135	23,0563	20,6595	2,3968	X		X	4 S	35
P 137	25,7457	21,3180	4,4277	X		X	3 S	33
P 138	21,8545	19,7055	2,1490	X	X	X	4 S	29
P 139	27,8181	21,9350	5,8831		X	X	4 P	43
P 140	23,9392	18,7162	5,2230			X	4 P	34
P 141	24,1991	19,5928	4,6063			X	4 S	33
P 142	23,2290	18,7618	4,4672	X		X	4 S	30
P 143	26,4928	19,0279	7,4650	X		X	4 S	33
P 144	27,1038	22,1642	4,9396	X		X	3 M	32
P 145	25,1119	21,5634	3,5484	X	X	X	4 S	38
P 146	23,2537	19,7152	3,5385		X	X	4 S	40
P 147	23,0393	19,3173	3,7220	X	X	X	4 P	26
P 148	23,3095	19,5915	3,7180		X	X	4 S	30
P 149	24,3287	20,5639	3,7648	X	X	X	4 S	36
Valor Médio	24,82147	20,48435	4,3371					

Nota: Ct, Threshold cycle; valores de Ct correspondentes à média de triplicata. Δ Ct = Ct HLA-G - Ct β -actina; EDT, grupo Endometriose; RS, retossigmóide; SUP, endometriose superficial, EOMA, endometrioma ovariano; PFD, endometriose profunda; M, menstrual; P proliferativa; S, secretora.

ANEXO IX – Análise da qualidade e integridade das amostras de RNA.

CTRL	Endométrio		EDT	Endométrio	
Identifi- cação	Razão 260/280 nm	RIN	Identifi- cação	Razão 260/280 nm	RIN
C 01	2,0	5,5	P 26	1,86	6,1
C 03	2,0	5,1	P 36	1,95	6,6
C 08	2,0	6,0	P 44	1,58	6,9
C 10	2,0	6,9	P 55	1,91	7,2
C 11	2,0	7,5	P 57	1,93	7,2
C 13	1,8	6,4	P 60	1,94	7,2
C 19	2,0	7,3	P 98	1,86	5,5
C 30	1,9	6,0	P 99	1,67	6,5
C 31	2,0	5,9	P 121	1,52	7,5
C 36	2,0	7,1	P 132	1,98	6,9
C 39	1,8	6,5	P 135	1,93	5,8
C 48	1,6	6,6	P 137	1,95	6,7
C 50	1,8	4,9	P 138	1,95	5,6
C 57	1,7	7,0	P 139	1,97	5,0
C 58	1,9	8,1	P 140	1,15	6,0
C 59	2,0	6,4	P 141	1,91	7,4
C 71	1,8	6,8	P 142	1,87	4,0
C 73	2,0	6,3	P 143	1,92	6,5
C 74	2,0	6,2	P 144	1,86	4,3
C 77	1,8	6,9	P 145	1,91	5,4
C 78	2,0	6,3	P 146	1,86	6,2
			P 147	1,65	7,3
			P 148	1,98	5,4
			P 149	1,89	5,8

Nota: CTRL, Controle; EDT, Endometriose; RIN, Número de integridade do RNA.

Avaliação da integridade de RNA utilizando o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent). **A.** imagem representa uma das amostras de RNA que foi quantificada e traz o valor de RIN (*RNA integrity number*), gerado pelo software. **A.** Gráfico mostrando os picos de 18S e 28S. **B.** Gel virtual com as bandas representativas de 28S e 18S.

ANEXO X – Avaliação imunohistoquímica da expressão da proteína HLA-G em tecidos de endométrio e de lesão de endometriose e dados clínicos dos grupos Controle e Endometriose.

a. Avaliação Imunohistoquímica de HLA-G no endométrio e dados clínicos do grupo Controle.

GRUPO CONTROLE									
IMUNORREATIVIDADE HISTOQUÍMICA DE HLA-G NO ENDOMÉTRIO									
EPITÉLIO GLANDULAR			ESTROMA			IRS FINAL	DADOS CLÍNICOS		
Identificação da Paciente	Distribuição	Intensidade	IRS Epitelial	Distribuição	Intensidade	IRS Estromal	Score	Fase Hormonal	Idade
C 01	3	1	3	0	0	0	1,5	M	26
C 03	3	1	3	0	0	0	1,5	M	36
C 11	3	1	3	0	0	0	1,5	P	29
C 12	3	1	3	0	0	0	1,5	P	25
C 13	3	2	6	0	0	0	3	P	35
C 21	4	1	4	0	0	0	2	P	35
C 22	4	2	8	0	0	0	4	P	43
C 23	3	2	6	0	0	0	3	P	32
C 25	3	2	6	0	0	0	3	P	33
C 28	3	1	3	0	0	0	1,5	P	26
C 29	4	3	12	0	0	0	6	P	34
C 46	2	2	4	0	0	0	2	S	25
C 50	4	1	4	0	0	0	2	S	29
C 56	4	2	8	0	0	0	4	S	38
C 57	4	1	4	0	0	0	2	S	40
C 58	4	3	12	0	0	0	6	S	32
C 71	3	2	6	0	0	0	3	P	30
C 72	3	1	3	0	0	0	1,5	P	46
C 73	4	1	4	0	0	0	2	P	29
C 74	4	2	8	0	0	0	4	P	25
C 75	3	2	6	0	0	0	3	P	36
C 76	1	1	1	0	0	0	0,5	P	38

Nota: IRS, score de imunoreatividade; IRS Final, corresponde à media entre o IRS Epitelial e o IRS Estromal; M, menstrual; P, Proliferativa; S, Secretora. As 16 primeiras mulheres discriminadas (C01 a C58) tiveram determinadas as concentrações da proteína HLA-G solúvel no soro e no fluido peritoneal, cujos valores encontram-se no Anexo VI.a.

b. Dados estatísticos da expressão da proteína HLA-G no endométrio de pacientes do grupo Controle .

CTRL (n=16)	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL	Idade
Valor Mínimo	0	0	0	25
Percentil 25	3	0	1,5	26
Valor Mediano	4	0	2,0	29,5
Percentil 75	6	0	3	35
Valor Máximo	8	0	4	46
Valor Médio	4,1	0	2,0	31,6
Desvio Padrão	2,6	0	1,3	6,4
Valor <i>p</i>	0,0015			

Nota: IRS, *score* de imunoreatividade; IRS Final, corresponde à media entre o IRS Epitelial e o IRS Estromal; *n*, número amostral; *p*, índice de significância estatística.

c. Avaliação Imunohistoquímica de HLA-G em tecidos de endométrio e de lesão de endometriose e dados clínicos do grupo Endometriose.

GRUPO ENDOMETRIOSE		IMUNORREATIVIDADE HISTOQUÍMICA DE HLA-G									
IDENTIFICAÇÃO		EPITÉLIO GLANDULAR			ESTROMA			IRS FINAL	DADOS CLÍNICOS		
Identificação da Paciente	Tecido	Distribui- ção	Intensi- dade	IRS Epitelial	Distribui- ção	Intensi- dade	IRS Estromal	Score	Fase Hormonal	Estádio	Idade
P 44	Lesão RS	4	2	8	0	0	0	4	S	4	27
	Endométrio	4	2	8	2	1	2	5			
P 45	Lesão RS	4	3	12	1	1	1	6,5	S	4	30
	Endométrio	4	3	12	3	2	6	9			
P 53	Lesão RC	4	3	12	0	0	0	6	P	2	41
	Endométrio	4	3	12	1	1	1	6,5			
P 62	Lesão RS	4	3	12	0	0	0	6	S	2	35
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			
P 63	Lesão RS	4	1	4	1	1	1	2,5	M	1	39
	Endométrio	2	1	2	1	1	1	1,5			
P 92	Lesão RS	4	1	4	0	0	0	2	P	1	44
	Endométrio	3	1	3	0	0	0	1,5			
P 93	Lesão RS	4	2	8	0	0	0	4	M	2	35
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			
P 94	Lesão RC	4	3	12	0	0	0	6	S	2	35
	Endométrio	4	2	8	0	0	0	4			
P 96	Lesão RC	4	3	12	0	0	0	6	S	3	25
	Endométrio	4	3	12	1	1	1	6,5			
P 101	Lesão RC	4	1	4	0	0	0	2	S	3	34
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 104	Lesão RC	3	1	3	0	0	0	1,5	P	2	27
	Endométrio	2	1	2	0	0	0	1			
P 106	Lesão RC	3	1	3	0	0	0	1,5	P	2	38
	Endométrio	3	1	3	0	0	0	1,5			
P 108	Lesão RC	3	1	3	0	0	0	1,5	M	2	34
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 120	Lesão RC	3	2	6	0	0	0	3	M	4	40
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			
P 124	Lesão RS	3	1	3	0	0	0	1,5	M	2	41
	Endométrio	3	1	3	0	0	0	1,5			
P 126	Lesão RS	4	2	8	0	0	0	4	S	4	33
	Endométrio	4	2	8	0	0	0	4			
P 127	Lesão RS	4	3	12	0	0	0	6	P	3	46
	Endométrio	2	1	2	0	0	0	1			
P 128	Lesão RC	4	2	8	0	0	0	4	S	4	21,0
	Endométrio	4	2	8	0	0	0	4			
P 129	Lesão RS	4	3	12	0	0	0	6	S	2	26
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 130	Lesão RS	3	1	3	0	0	0	1,5	S	4	32
	Endométrio	3	1	3	0	0	0	1,5			
P 131	Lesão RS	4	2	8	0	0	0	4	S	2	37
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			
P 132	Lesão RS	4	1	4	0	0	0	2	S	4	42
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 133	Lesão RS	4	1	4	0	0	0	2	S	3	29
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 134	Lesão RS	4	3	12	0	0	0	6	P	4	38
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			
P 135	Lesão RS	4	2	8	0	0	0	4	S	4	35
	Endométrio	4	1	4	0	0	0	2			
P 136	Lesão RS	4	3	12	0	0	0	6	S	4	39
	Endométrio	4	3	12	0	0	0	6			

Nota: IRS, score de imunoreatividade; IRS Final, corresponde à media entre o IRS Epitelial e o IRS Estromal; RC, retrocervical; RS retossigmM, menstrual; P, Proliferativa; S, Secretora. As 22 primeiras mulheres discriminadas (P44 a P132) tiveram determinadas as concentrações da proteína HLA-G solúvel no soro e no fluido peritoneal, cujos valores encontram-se no Anexo VI.b.

d. Dados estatísticos da expressão da proteína HLA-G no grupo Endometriose e dados clínicos.

GRUPO ENDOMETRIOSE										
Identificação da paciente	ENDOMÉTRIO			DADOS CLÍNICOS				LESÃO DE ENDOMETRIOSE		
	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL	Local da Lesão	Estádio	Fase Hormonal	Idade	IRS Epitelial	IRS Estromal	IRS FINAL
P 63	2	1	1,5	RS	1	M	39	4	1	2,5
P 149	3	0	1,5	RC	2	M	41	3	0	1,5
P 108	4	0	2	RS	2	M	34	3	0	1,5
P 92	3	0	1,5	RC	1	P	44	4	0	2
P 53	12	1	6,5	RC	2	P	41	12	0	6
P 104	2	0	1	RS	2	P	27	3	0	1,5
P 106	3	0	1,5	RS	2	P	38	3	0	1,5
P 137	2	0	1	RC	3	P	46	12	0	6
P 62	12	0	6	RS	2	S	35	12	0	6
P 94	8	0	4	RC	2	S	35	12	0	6
P 148	4	0	2	RC	2	S	26	12	0	6
P 96	12	1	6,5	RC	3	S	25	12	0	6
P 151	4	0	2	RC	3	S	29	4	0	2
P 101	4	0	2	RC	3	S	34	4	0	2
P 44	8	2	5	RS	4	S	27	8	0	4
P 45	12	6	9	RS	4	S	30	12	1	6,5
P 130	3	0	1,5	RS	4	S	32	3	0	1,5
P 147	4	0	2	RS	4	S	42	4	0	2
P 150	12	0	6	RS	4	S	39	12	0	6
n	19	19	19				19	19	19	19
Mínimo	2	0	1,0				25	3	0	1,5
PC 25%	3	0	1,5				29	3	0	1,5
Mediano	4	0	2,0				35	4	0	2,5
PC 75%	12	1	6,0				41	12	0	6
Máximo	12	6	9,0				46	12	1	6,5
Médio	6	0,58	3,3				35,0	7,3	0,11	3,7
DP	4,028	1,4	2,4				6,4	4,2	0,32	2,1
p	< 0.0001							< 0.0001		

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrich JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003; 82:31-40.
- Afshar Y, Hastings J, Roqueiro D, Jeong JW, Giudice LC, Fazleabas AT. Changes in eutopic endometrial gene expression during the progression of experimental endometriosis in the baboon, *Papio anubis*. *Biol Reprod.* 2013 Feb 21;88(2):44.
- Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:795976. Review.
- Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2001 Dec; 7(12):1167-72.
- Al-Sabbagh M, Lam EW, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 358:208-15.
- 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; 84:1705-1711.
- Arimoto T, Katagiri T, Oda K, Tsunoda T, Yasugi T, Osuga Y, Yoshikawa H, Nishii O, Yano T, Taketani Y, Nakamura Y. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene-expression profiles involved in ovarian endometriosis. *Int J Oncol.* 2003 Mar; 22(3):551-60.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Aug;85(8):2897-902.
- Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Löning T, Bamberger MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Oct; 85(10):3932-6.
- Barbieri RL. Stenosis of the external cervical os: an association with endometriosis in women with chronic pelvic pain. *Fertil Steril.* 1998 Sep;70(3):571-3.
- Barrier BF, Kendall BS, Sharpe-Timms KL, Kost ER (Barrier et al., 2006a). Characterization of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2006 Oct;103(1):25-30.
- Barrier BF, Kendall BS, Ryan CE, Sharpe-Timms KL (Barrier et al., 2006b). HLA-G is expressed by the glandular epithelium of peritoneal endometriosis but not in eutopic endometrium. *Hum Reprod* 2006; 21:864-9.
- Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, Russell P, Fraser IS. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod.* 2010. 25(4):900-7.
- Borrelli GM, Abrão MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Köhler C, Chiantera V, Mechsner S. (Partial) Loss of BAF250a (ARID1A) in rectovaginal deep-infiltrating endometriosis, endometriomas and involved pelvic sentinel lymph nodes. *Mol Hum Reprod* 2016;22: 329-337.
- Boyson JE, Erskine R, Whitman MC, Chiu M, Lau JM, Koopman LA, Valter MM, Angelisova P, Horejsi V, Strominger JL. Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10; 99(25):16180-5.

- Braun DP, Gebel H, Rana N, Dmowski WP. Cytolysis of eutopic and ectopic endometrial cells by peripheral blood monocytes and peritoneal macrophages in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1998 Jun; 69(6):1103-8.
- Braun DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowski WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992;57: 1203-1210.
- Brenol CV, Veit TD, Chies JA, Xavier RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol*. 2012 Jan-Feb;52(1):82-91. Review.
- Bruner-Tran KL, Herington JL, Duleba AJ, Taylor HS, Osteen KG. Medical management of endometriosis: emerging evidence linking inflammation to disease pathophysiology. *Minerva Ginecol*. 2013 Apr; 65(2):199-213. Review.
- Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H, Utsunomiya H, Yin P, Luo X, Lin Z, Imir G, Thung S, Su EJ, Kim JJ. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2010 Jan; 28(1):36-43. Review.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Mar 27; 248(1-2):94-103. Review.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360(3):268-79. Review.
- Cao M, Yie SM, Liu J, Ye SR, Xia D, Gao E. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens*. 2011 Aug;78(2):120-8.
- Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003; 81:199-252.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol*. 2008; 29:125-32.
- Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, Donadi EA, Mendes-Junior CT (Castelli et al., 2014a). Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol*. 2014.Oct 6; 5:476.
- Castelli EC, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Moreau P, Donadi EA (Castelli et al., 2014b). Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. *J Immunol Res*. 2014; 2014:734068. Review.
- Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V, Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2007 Sep; 12(3):194-202. Review.
- Chen BG, Xu DP, Lin A, Yan WH. NK cytotoxicity is dependent on the proportion of HLA-G expression. *Hum Immunol*. 2013 Mar; 74(3):286-9.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- Chuang PC, Lin YJ, Wu MH, Wing LY, Shoji Y, Tsai SJ. Inhibition of CD36-dependent phagocytosis by prostaglandin E2 contributes to the development of endometriosis. *Am J Pathol*. 2010; 176:850-60.

- Clements CS, Kjer-Nielsen L, Kostenko L, Hoare HL, Dunstone MA, Moses E, Freed K, Brooks AG, Rossjohn J, McCluskey J. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1; 102(9):3360-5.
- Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, Puppo F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol*. 2003 Jan; 33(1):125-34.
- Djurisic S, Hviid TV. HLA Class Ib Molecules and Immune Cells in Pregnancy and Preeclampsia. *Front Immunol*. 2014 Dec 23; 5:652. Review.
- Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytotoxicity of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998 Sep-Oct; 4(5):696-701.
- Eidukaite A, Tamosiunas V. Soluble HLA-G in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2008; 89:465–467
- Evans J, Salamonsen LA. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012 Dec; 13(4):277-88. Review.
- Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, Herault JP, Gueguen G, Bono F, Savi P, Aguerre-Girr M, Fournel S, Malecaze F, Bensussan A, Plouët J, Le Bouteiller P. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2608-15.
- Fairbanks FMD, Abrao MS, Podgaec S, Dias Jr JA, de Oliveira RM, Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis *Fertil Steril* 2009; 91 (2) 320-4.
- Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, Wiendl H. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood*. 2007 Jul 15;110(2):568-77
- Fliege S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):126-39. Review
- Gallinelli A, Chiossi G, Giannella L, Marsella T, Genazzani AD, Volpe A: Different concentrations of interleukins in the peritoneal fluid of women with endometriosis: relationships with lymphocyte subsets. *Gynecol Endocrinol* 2004; 18:144-151.
- Garzetti, G.G.; Ciavattini, A.; Provinciali, M.; Fabris, N.; Cignitti, M.; Romanini, C. Natural killer cell activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet. Gynecol*. 1993, 81, 665-668.
- Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1998 Jun; 69(6):1042-7.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; Nov 13-19; 364(9447):1789-99.
- González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S, Lousse JC, Colette S, Devoto L, Donnez J. Involvement of the nuclear factor- κ B pathway in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):1985-94.

- Gregori S, Amodio G, Quattrone F, Panina-Bordignon P. HLA-G Orchestrates the Early Interaction of Human Trophoblasts with the Maternal Niche. *Front Immunol*. 2015 Mar 30;6:128.
- Gregori S, Magnani CF, Roncarolo MG. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum Immunol*. 2009 Dec;70(12):966-9. doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.022. Epub 2009 Aug 4. Review.
- Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010 Aug 12; 116(6):935-44. Erratum in: *Blood*. 2011 Nov 3; 118(18):5060.
- Gros F, Sebti Y, de Guibert S, Branger B, Bernard M, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* 2006 Mar; 8(3):223-30.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984 Aug; 64(2):151-4.
- Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, Paschopoulos M, Paraskevidis E, Terakawa N. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2004 Jan-Feb; 10(1):29-38. Review.
- Harada, T.; Taniguchi, F.; Izawa, M.; Ohama, Y.; Takenaka, Y.; Tagashira, Y.; Ikeda, A.; Watanabe, A.; Iwabe, T.; Terakawa, N. Apoptosis and endometriosis. *Front. Biosci*. 2007, 12, 3140-3151.
- Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA, Osteen KG. Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Sep; 7(5):611-26.
- Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006 May-Jun; 12(3):209-32. Review.
- Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY: Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10:2671–2675.
- Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE: Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67:1059–1064.
- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6838-45.
- Ibrahim EC, Morange M, Dausset J, Carosella ED, Paul P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Jul;5(3):207-18.
- Imamura T, Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Ishimaru T, Masuzaki H. Effect of GnRH agonist therapy on the expression of human heat shock protein 70 in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Sep;180:16-23.
- Javert CT. The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement. *Am J Obstet Gynecol*. 1952 Oct;64(4):780-806

- Jeong S, Park S, Park BW, Park Y, Kwon OJ, Kim HS. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS One*. 2014 May 28; 9(5):e98284.
- Jung YW, Kim YT, Kim SW, Kim S, Kim JH, Cho NH, Kim JW. Correlation of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression and disease progression in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci*. 2009 Nov; 16(11):1103-11.
- Kamergorodsky G, Ribeiro PA, Galvão MA, Abrão MS, Donadio N, Lemos NL, Aoki T. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril*. 2009 Dec;92(6):2074-7.
- Kapasi K, Albert SE, Yie S, Zavazava N, Librach CL. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. *Immunology* 2000 Oct;101(2):191-200.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*. 2003; 144:2870–81.
- Kawashima M, Maeda N, Adachi Y, Takeuchi T, Yamamoto Y, Izumiya C, Hayashi K, Furihata M, Udaka K, Fukaya T. Human leukocyte antigen-G, a ligand for the natural killer receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase. *Fertil Steril*. 2009 Feb; 91(2):343-9.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H (Khan KN et al., 2008a). Immunopathogenesis of Pelvic Endometriosis: Role of Hepatocyte Growth Factor, Macrophages and Ovarian Steroids. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:383-404.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H. Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2009;68(1):40-52.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, Nakashima M, Fujishita A, Ishimaru T, Masuzaki H. *Escherichia coli* contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril*. 2010 Dec;94(7):2860-3.e1-3.
- Khan KN, Kitajima M, Imamura T, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, Masuzaki H (Khan KN et al., 2008b). Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70. *Hum Reprod*. 2008 Oct;23(10):2210-9.
- Khan KN, Kitajima M, Inoue T, Tateishi S, Fujishita A, Nakashima M, Masuzaki H. Additive effects of inflammation and stress reaction on Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriotic stromal cells. *Hum Reprod*. 2013 Oct;28(10):2794-803.
- Khan MA, Sengupta J, Mittal S, Ghosh D. Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Sep 24; 10:84.
- Kitawaki, J.; Xu, B.; Ishihara H.; Fukui, M.; Hasegawa, G.; Nakamura, N.; Mizuno, S.; Otha, M.; Obayashi, H.; Honjo, H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with susceptibility to endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2007, 58, 481-486.
- Kleinberg L, Flørenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2006;449(1):31–9.

- Kusume T, Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Hayashi K, Oguri H, Nishimori Y, Fukaya T. Human leukocyte antigen expression by peritoneal macrophages from women with pelvic endometriosis is depressed but coordinated with costimulatory molecule expression. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83 Suppl 1:1232-40.
- Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Dec 2; 1:123. Review.
- Lee KS, Baek DW, Kim KH, Shin BS, Lee DH, Kim JW, Hong YS, Bae YS, Kwak JY: IL-10-dependent down-regulation of MHC class II expression level on monocytes by peritoneal fluid from endometriosis patients. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:1699–1712.
- Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, et al. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6133–9.
- Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, McMaster M, Dausset J, Carosella ED, et al. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 2002; 196:266-74.
- LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(18):7064-7069.
- Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, Mall G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod*. 2002 Oct;17(10):2725-36.
- Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet*. 2009 Oct;280(4):529-38.
- Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 17; 105(24):8357-62.
- Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986 Aug; 93(8):859-62.
- Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: William Wood Russell. *Johns Hopkins Hospital Bulletin*, vol. 10, pp. 8--10, 1899. *Am J Obstet Gynecol*. 1979 May 15;134(2):225-6.
- Lozano JM, González R, Kindelán JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, Carosella ED, Peña J. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS*. 2002 Feb 15;16(3):347-51.
- Mach P, Blecharz P, Basta P, Marianowski P, Skret-Magierlo J, Kojs Z, Grabiec M, Wicherek L. Differences in the soluble HLA-G blood serum concentration levels in patients with ovarian cancer and ovarian and deep endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2010 May;63(5):387-95.
- Maeda N, Izumiya C, Taniguchi K, Matsushima S, Fukaya T. Role of NK cells and HLA-G in endometriosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jun 1;4:1568-81. Review.
- Măluțan AM, Drugan T, Ciortea R, Mocan-Hognogi RF, Bucuri C, Rada MP, Miha D (Malutan et al, 2015a). Serum anti-inflammatory cytokines for the evaluation of inflammatory status in endometriosis. *J Res Med Sci*. 2015 Jul;20(7):668-74.

- Malutan AM, Drugan T, Costin N, Ciortea R, Bucuri C, Rada MP, Mihu D (Malutan et al, 2015b). Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(1):96-102.
- Menier C, Saez B, Horejsi V, Martinozzi S, Krawice-Radanne I, Bruel S, Le Danff C, Reboul M, Hilgert I, Rabreau M et al. Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E: new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules. *Hum Immunol* 2003;64: 315-326.
- Menier C, Prevot S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Human leukocyte antigen-G is expressed in advanced-stage ovarian carcinoma of high-grade histology. *Hum Immunol*. 2009 Dec;70(12):1006-9.
- Meyer R. Ueber den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyom im Allgemeinen und insbesondere ueber Adenomyositis seroepithelialis und Adeno-myometritis sarcomatosa. *Zbl Gynaekol* 1919; 36:745–750.
- Mitsdoerffer M, Schreiner B, Kieseier BC, Neuhaus O, Dichgans J, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005 Feb;159(1-2):155-64.
- Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993; 72:560–564.
- Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Young SL, Lessey BA, Tayade C. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril*. 2015 Dec 14.
- Morandi F, Levreri I, Bocca P, Galleni B, Raffaghello L, Ferrone S, Prigione I, Pistoia V. Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer Res*. 2007 Jul1;67(13):6433-41.
- Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*. 1999 May; 11(5):803-11.
- Moreau P, Faure O, Lefebvre S, Ibrahim EC, O'Brien M, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. *Transplant Proc*. 2001 May; 33(3):2277-80.
- Mouillot G, Marcou C, Zidi I, Guillard C, Sangrouber D, Carosella ED, Moreau P. Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells. *Hum Immunol*. 2007 Apr; 68(4):277-85.
- Naji A, Le Rond S, Durrbach A, Krawice-Radanne I, Creput C, Daouya M, Caumartin J, LeMaoult J, Carosella ED, Rouas-Freiss N. CD3+CD4^{low} and CD3+CD8^{low} are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. *Blood* 2007 Dec 1;110(12):3936-48.
- Nawroth F, Rahimi G, Nawroth C, Foth D, Ludwig M, Schmidt T. Is there an association between septate uterus and endometriosis? *Hum Reprod*. 2006; 21:542–4.
- Nisolle, M. & J. Donnez: Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997; 68, 585-96.
- Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:174-9.

- 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.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR: Flow cytometry analysis of lymphocyte subpopulations in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1994; 31:25-31.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993;82: 206-212.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 58, 290-295.
- Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Jan; 65(1):1-10. Review.
- Pangault C, Le Friec G, Caulet-Maugendre S, Léna H, Amiot L, Guilloux V et al. Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases. *Hum Immunol* 2002; 63(2):83–90.
- Podgaec S, Abrao MS, Dias Jr J.A, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Human Reproduction* 2007; 22(5):1373–1379.
- Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM, Baracat EC, Abrao MS. TH1 and TH2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56:92–8.
- Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LFC, Baracat EC, Abrao MS. CD4⁺ CD25^{high}Foxp3⁺ cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2012; 68:301-8.
- Provatopoulou X, Kalogera E, Sagkriotis A, Zagouri F, Nonni A, Zografos GC, Gounaris A. Soluble human leukocyte antigen-G expression in patients with ductal and lobular breast malignancy. *Anticancer Res*. 2012 Mar;32(3):1021-6.
- Raiter-Tenenbaum A, Baranao RI, Etchepareborda JJ, Meresman GF, Rumi LS. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 1998; 261:147–57.
- Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med*. 1999 Apr 5;189(7):1093-100. Erratum in: *J Exp Med* 2000 Jun 5;191(11):following 2027.
- Rajagopalan S, Fu J, Long EO. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol*. 2001 Aug 15; 167(4):1877-81.
- Rajagopalan S, Long EO. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med*. 2005 Apr 4; 201(7):1025-9. Review.
- Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Hum Immunol*. 2003 Nov;64(11):1017-24.

- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997 May;67(5):817-21.
- Ristich V, Zhang W, Liang S, Horuzsko A. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Hum Immunol*. 2007 Apr;68(4):264-71.
- Rizzo R, Hviid TV, Stignani M, Balboni A, Grappa MT, Melchiorri L, Baricordi OR: The HLA-G genotype is associated with IL-10 levels in activated PBMCs. *Immunogenetics* 2005; 57:172–181
- Rouas-Freiss N, LeMaout J, Moreau P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G in transplantation: a relevant molecule for inhibition of graft rejection? *Am J Transplant*. 2003 Jan;3(1):11-6. Review
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, LeMaout J, Carosella ED. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol*. 2007 Dec; 17(6):413-21.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obst Gynecol* 1927; 14: 442-69.
- Sanfilippo JS, Wakim NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Jan;154(1):39-43.
- Schütt P, Schütt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, Opalka B, Eberhardt W, Schuler M, Horn PA, Rebmann V. Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Hum Immunol*. 2010 May; 71(5):489-95.
- Sebti Y, Le Friec G, Pangault C, Gros F, Drénou B, Guilloux V, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol*. 2003 Nov; 64(11):1093-101.
- Sebti Y, Le Maux A, Gros F, De Guibert S, Pangault C, Rouas-Freiss N, Bernard M, Amiot L. Expression of functional soluble human leukocyte antigen-G molecules in lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2007 Jul; 138(2):202-12.
- Selam B, Kayisli UA, Garcia-Velasco JA, Akbas GE, Arici A: Regulation of fas ligand expression by IL-8 in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:3921-3927.
- Selam B, Kayisli UA, Akbas GE, Basar M, Arici A: Regulation of FAS ligand expression by chemokine ligand 2 in human endometrial cells. *Biol Reprod*. 2006; 75:203-209.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008 Jan; 26(1):212-22.
- Semino C, Semino A, Pietra G, et al. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil. Steril*. 1995; 64(5): 909–916.
- Shankarkumar U, Shankarkumar A, Chedda Z, Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci*. 2011 Sep; 4(3):143-6.

- Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991 Jun;39(6):741-8.
- Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem*. 1993 Nov;41(11):1599-604.
- Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, Kato K, Kohda D, Maenaka K. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16412-7.
- Somigliana E, Viganò P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update*. 1999 Jan-Feb; 5(1):40-51. Review.
- Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ: Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1984; 6:33–36.
- Suen JL, Chang Y, Chiu PR, Hsieh TH, Hsi E, Chen YC, Chen YF, Tsai EM. Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. *Am J Pathol*. 2014 Feb;184(2):464-71.
- 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 May 1;8:a70-8.
- Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S, Hiroi M. Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 1992; 34(1):27-30.
- Tariverdian N, Theoharides TC, Siedentopf F, Gutiérrez G, Jeschke U, Rabinovich GA, Blois SM, ArckPC. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol* 2007; 29:193
- Tariverdian N, Siedentopf F, Rütke M, Blois SM, Klapp BF, Kentenich H, Arck PC. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2009 Jun;80(1-2):80-90.
- Tirado-González I, Freitag N, Barrientos G, Shaikly V, Nagaeva O, Strand M, Kjellberg L, Klapp BF, Mincheva-Nilsson L, Cohen M, Blois SM. Galectin-1 influences trophoblast immune evasion and emerges as a predictive factor for the outcome of pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 2013 Jan; 19(1):43-53.
- Urošević M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, Stahel RA, Dummer R, Trojan A. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol*. 2001 Sep; 159(3):817-24.
- Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014 Jun;44(6):1582-92.
- Wang F, Wen Z, Li H, Yang Z, Zhao X, Yao X. Human leukocyte antigen-G is expressed by the eutopic and ectopic endometrium of adenomyosis. *Fertil Steril*. 2008 Nov; 90(5):1599-604.
- Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PA. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1995 Aug; 64(2):340-6.

- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol.* 2002; 168: 4772–80.
- Wu MH, Shoji Y, Wu MC, Chuang PC, Lin CC, Huang MF, Tsai SJ. Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. *Am J Pathol.* 2005 Oct; 167(4):1061-9.
- 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; 74:1187–1191.
- Xu DP, Shi WW, Zhang TT, Lv HY, Li JB, Lin A, Yan WH. Elevation of HLA-G-expressing DC-10 cells in patients with gastric cancer. *Hum Immunol.* 2016 Jan 8. pii: S0198-8859(16)00004-5.
- Yang Y, Chu W, Geraghty DE, Hunt JS. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. *J Immunol.* 1996 Jun 1;156(11):4224-31.
- Yang JH, Chen MJ., Chen HF, Lee, TH, Ho HN, Yang YS. Decreased expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells in eutopic endometrium in women with adenomyosis. *Hum. Reprod.* 2004, 19, 1974-1978.
- Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod.* 2006 Oct; 21(10):2538-44.
- Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, Pereira RM, Taylor HS, Motta EL, Baracat EC, Serafini PC. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Dec;27(12):701-10
- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17betaestradiol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:4474–4480
- Zidi I, Guillard C, Marcou C, Krawice-Radanne I, Sangrouber D, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Moreau P. Increase in HLA-G1 proteolytic shedding by tumor cells: a regulatory pathway controlled by NF-kappaB inducers. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Nov; 63(22):2669-81.
- Zilberman S, Schenowitz C, Agaugué S, Benoît F, Riteau B, Rouzier R, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Menier C. HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. *Eur J Immunol.* 2012 Jun; 42(6):1599-608.
- ImMunoGeneTics- IMGT/HLA*, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>.
- NCBI/ Primer-BLAST*, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast).
- NCBI Reference Sequence*, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore).