

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCELO GONDIM ROCHA

**Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica -
Identificação de possíveis marcadores séricos da doença**

RIBEIRÃO PRETO

2010

MARCELO GONDIM ROCHA

**Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica -
Identificação de possíveis marcadores séricos da
doença**

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

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto

RIBEIRÃO PRETO

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Marcelo Gondim

Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica - Identificação de possíveis marcadores séricos da doença, 2010.

74 p. il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Poli-Neto, Omero Benedicto

1. Dor pélvica crônica.
2. Óxido nítrico.
3. Metaloproteinases.
4. Inflamação.
5. Endometriose.
6. Síndrome miofascial.

Dedicatória

A minha mãe, **Marilena Gondim Rocha**, minha grande amiga e incentivadora. Médica extremamente dedicada que, através de seu exemplo de força e luta, contribuiu imensamente para minha formação pessoal.

A meu pai, **Marcelo de Pontes Rocha**, um dos grandes responsáveis por essa minha trajetória. Médico competente e dedicado que também fez dessa casa a sua casa há alguns anos. Com sua determinação, ensinou-me a buscar meus objetivos e batalhar por eles, assim como ele o fez. É um orgulho enorme ser filho de vocês e almejo, algum dia, ser um pai tão bom quanto vocês são.

As minhas irmãs, **Mariella Gondim Rocha e Carolina Gondim Rocha**, minhas amigas de toda hora. Com elas aprendi o valor da amizade, da união, enfim, da família.

Aos meus queridos sobrinhos, **Marina e Bernardo**, vocês são uma das grandes felicidades da minha vida.

Ao meu cunhado, **Cleto Dantas Nogueira**, um grande médico e um grande amigo.

A minha noiva, **Luciana Azôr Dib**, minha amiga e companheira de todos os momentos. Com sua paciência e seu amor me ensinou a querer ser uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, **Omero Benedicto Poli Neto**, por ter contribuído indiscutivelmente para a minha formação profissional; por ter sido um grande amigo e ter confiado em mim em todos os momentos desta longa caminhada.

Agradecimientos

A Deus que sempre esteve ao meu lado, dando-me força e coragem para alcançar meus objetivos, apesar das adversidades encontradas nesta trajetória.

A todos os meus familiares que sempre estiveram ao meu lado e, mesmo a milhares de quilômetros, conseguiam estar bem perto.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela disponibilidade em ceder seu laboratório para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro, grande pesquisador, por ter aceitado participar da minha banca de mestrado.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, pela oportunidade de fazer meu mestrado neste setor. À grande amiga Suelen Bezerra, pela disponibilidade e paciência e ao professor Antonio Alberto Nogueira, um verdadeiro pai. Sempre disponível e com um grande sorriso no rosto, ajudando no que fosse preciso.

A todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (docentes, médicos contratados e, principalmente, meus queridos residentes), pela minha formação profissional.

A todos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilidade em ajudar quando necessário, em especial a Ilza, Ricardo, Reinaldo e Rosane.

A todos que trabalham no Ambulatório de Dor Pélvica Crônica, por terem tornado possível a realização desse trabalho.

Aos amigos da Pós-graduação pela convivência diária e sempre divertida, pelo companheirismo e pela troca de aprendizado e favores durante esse período de especialização.

A todos os meus amigos que conheci em Ribeirão Preto em especial a Ana Carolina dos Santos Calderon, Anderson Sanches de Melo, Isa Alves Rocha, Ercilene Moraes Martins Yamaguti, Maria Rita de Figueiredo Bagio, Sany Rose Bevervanso Ferrarese e Soraia Sanches Nakamura, que muito me ajudaram para concretização desta etapa de vida.

À grande docente e amiga Carolina Sales Vieira de Macedo, excelente e dedicada profissional, pela confiança e incentivo diário.

Aos “meus pais” em Ribeirão Preto, Bira e Raquel, pelo amor e carinho dispensados durante esses quase seis anos longe de casa.

Aos meus eternos amigos cearenses de Ribeirão Preto: Dráulio e Ju, Lívia e Eduardo, Camilo, Gerardo, Bitu, Rômulo, Bob, por tornarem a minha vida aqui ainda mais feliz.

Às mulheres que participaram deste estudo como voluntárias, pela colaboração e pela confiança depositada.

À FAPESP, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro imprescindível na confecção desta pesquisa.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

Epígrafe

*“Heaven
I'm in heaven
And my heart beats
So that I can hardly speak
And I seem to find
The happiness I seek....”*

Irving Berlin

ROCHA, MG. **Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica – Identificação de possíveis marcadores séricos da doença.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: Dor pélvica crônica é uma doença de elevada prevalência e fisiopatologia complexa. Os métodos diagnósticos muitas vezes são insuficientes e, em decorrência, o tratamento e seguimento das mulheres é difícil. Inúmeras doenças que se apresentam com dor crônica tem um perfil inflamatório, que ainda não foi investigado para o tema em questão.

Objetivos: Quantificar os níveis de óxido nítrico (NO) e das metaloproteinases 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) no plasma de mulheres com dor pélvica crônica.

Pacientes e métodos: Foram incluídas 64 mulheres, subdivididas em 02 grupos: dor pélvica crônica e grupo controle, com 37 pacientes no primeiro grupo e 27 pacientes no segundo grupo. As pacientes do grupo de estudo eram seguidas no Ambulatório de Dor Pélvica e Endoscopia e as pacientes do grupo controle eram seguidas no Ambulatório de Anticoncepção do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foi realizada a mensuração clínica da dor através de uma escala unidimensional (VAS) e uma escala multidimensional (McGill). Também foram preenchidas as escalas de ansiedade e depressão (HAD). Indivíduos com qualquer evidência de processos inflamatórios, hipertensão, tabagismo ou uso de contraceptivos hormonais foram excluídos. Indivíduos tomando medicação para a dor, como analgésicos ou antiinflamatórios foram solicitados a pará-los 72 horas antes de participar do estudo. Foi coletada uma amostra sanguínea de 10 ml, no ato da consulta. Esse material foi armazenado em frasco próprio com anti-coagulante, processado imediatamente no local para separação do plasma e armazenado em freezer, a -70C para mensuração subsequente. As concentrações de espécies relacionadas ao NO (nitrito) em líquidos foram medidas, sempre em triplicata, pelo método da quimioluminescência, que é um dos métodos mais simples, sensíveis

e precisos disponíveis para medir NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol. A atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma serão determinadas pelo método da zimografia, que consiste em uma eletroforese das amostras em um sistema SDS/PAGE que inclui o substrato da enzima (gelatina) no gel de separação, de modo a permitir a evidenciação e quantificação da atividade da enzima.

Resultados: Os níveis plasmáticos de NO foram maiores nas pacientes com DPC quando comparadas às pacientes do grupo controle (16.8 ± 7.9 versus 12.2 ± 2.4 , respectivamente ($P = 0.0016$)). Especificamente, os níveis plasmáticos de NO foram maiores nas pacientes com DPC de origem visceral quando comparadas às pacientes com dor exclusivamente somática ou aos controles saudáveis (19.2 ± 8.9 versus 12.4 ± 1.8 versus 12.2 ± 2.4 , respectivamente) ($P=0.0001$). Não observamos uma correlação entre os níveis plasmáticos de NO e a duração dos sintomas (em meses) (Spearman $r = 0.04$, 95%CI:-0.34 to 0.40, $P = 0.84$) ou com a intensidade dos sintomas dolorosos: EAV (Spearman $r = -0.18$, 95%CI:-0.52 to 0.20, $P=0.34$), ou McGill (Spearman $r = -0.06$, 95%CI:-0.41 to 0.30, $P =0.72$). Com relação às MMP's, não houve diferença estatística entre os dois grupos.

Conclusões: Os níveis plasmáticos de NO encontram-se elevados em mulheres com DPC, especialmente naquelas com dor de origem visceral. Este fato pode ser considerado uma possibilidade no seguimento de pacientes com DPC, visto que pode ser usado como um marcador sérico para a doença. Já a dosagem das MMP-s não se mostrou útil como marcador plasmático para mulheres com DPC.

Palavras-chave: Dor pélvica crônica; óxido nítrico; metaloproteinases; inflamação; endometriose, síndrome miofascial.

Abstract

ROCHA, MG. **Inflammatory mediators in women with chronic pelvic pain.** Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Background: Chronic pelvic pain is a disease of high prevalence and a complex pathophysiology. The diagnostic methods are often inadequate and, consequently, treatment and follow-up of women is quite difficult. Several diseases that present with chronic pain has an inflammatory profile, which has not yet been investigated for the topic. Aim: to quantify levels of nitric oxide (NO) and metalloproteinases 2 (MMP-2) and 9 (MMP-9) in plasma of women with chronic pelvic pain. Methods: 64 women were included in the study and divided into 02 groups: chronic pelvic pain and control group with 37 patients in the first group and 27 patients in the second group. Patients in the study group were followed at the Endoscopy and Pelvic Pain Unit and the control group patients were followed in the Contraception Unit of the Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto – University of São Paulo. We performed the measurement of clinical pain by a unidimensional scale (VAS) and a multidimensional scale (McGill). Anxiety and depression scales were also filled. Individuals with any evidence of inflammation, hypertension, smoking or use of hormonal contraceptives were excluded. Individuals taking medication for pain, such as painkillers or anti-inflammatory drugs were asked to stop them 72 hours before entering the study. A blood sample was collected from 10 ml during the appointment. This material was stored in bottle itself with anti-coagulant (EDTA and / or heparin), processed immediately on site for plasma separation and stored in a -70 °C freezer. The concentrations of species related to NO were measured in liquid, always in triplicate by the method of chemiluminescence, which is one of the most simple, sensitive and accurate available to measure NO. We used a NO analyzer (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, USA), which allows the measurement of NO in quantities as small as 1 pmol. The activity of MMP-2 and MMP-9 in plasma was

determined by the zymography method, which consists of an electrophoresis of the samples in an SDS / PAGE system, which includes the enzyme substrate (gelatin) in the gel separation, allowing the disclosure and quantification of enzyme activity. Results: Plasma NO levels were higher in CPP women than in controls (16.8 ± 7.9 versus 12.2 ± 2.4 , respectively) ($P=0.0016$). Furthermore, plasma nitrate levels were higher in CPP women with evidence of pain of visceral origin than in CPP women with evidence of an exclusive somatic component or controls (19.2 ± 8.9 versus 12.4 ± 1.8 versus 12.2 ± 2.4 , respectively) ($P=0.0001$). No correlation was detected between NO levels and duration of symptoms or intensity of pain. Regarding the MMP's, there was no statistical difference between the two groups. Conclusion: Plasma levels of NO are elevated in women with CPP, especially those with visceral pain. This fact can be considered an option in treating patients with CPP as it can be used as a serum marker for the disease. On the other hand, MMP's did not turn out to be a good serum marker for women with CPP.

Key words: chronic pelvic pain, visceral pain, nitric oxide, metalloproteinases, inflammation, endometriosis.

Tabela 1. Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo	50
--	----

Gráfico 1 - Concentração de Óxido Nítrico no plasma de mulheres com dor pélvica crônica	51
Gráfico 2 - Concentração de Metaloproteinase - 2 no plasma de mulheres com dor pélvica crônica	52
Gráfico 3 - Concentração de Metaloproteinase – 9 no plasma de mulheres com dor pélvica crônica	53

Lista de Abreviaturas

NO – Óxido nítrico

DPC – Dor pélvica crônica

MMP-2 – Metaloproteinase 2

MMP-9 – Metaloproteinase 9

NOS – Óxido nítrico sintetase

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida

nNOS – Óxido nítrico sintetase neuronal

eNOS - Óxido nítrico sintetase endotelial

MEC – Matriz extracelular

TIMP – Inibidor tecidual das metaloproteinases

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Fisiopatologia	28
1.2 Dor como evento inflamatório	28
1.3 O papel da inflamação neurogênica	29
1.4 Óxido nítrico e inflamação	30
1.5 Associação entre óxido nítrico e doenças associadas à dor pélvica crônica	30
1.6 Evidências da associação entre óxido nítrico e dor pélvica crônica	31
1.7 Metaloproteinases e inflamação tecidual	32
1.8 Associação entre MMPs e doenças associadas à dor pélvica crônica	33
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
4.1 Casuística	39
4.1.1 Casos	39
4.1.2 Controles	39
4.2 Critérios de inclusão	40
4.2.1 Casos	40
4.2.2 Controles	40
4.3 Critérios de exclusão	40
4.4 Métodos	40
4.4.1 Modelo de Estudo	40
4.4.2 Variáveis do Estudo	41
4.4.3 Mensuração clínica da dor	42
4.4.3.1 Unidimensional	42
4.4.3.2 Multidimensional	42
4.4.3.3 Outras	43
4.5 Operacionalização	44
4.5.1 Instrumento para coleta de informações – formulário	44
4.5.2 Coleta do sangue	44
4.5.3 Determinação das concentrações plasmáticas de nitratos	44
4.5.4 Determinação das atividades plasmáticas de MMP-2 e MMP-9	46

4.6 Banco de dados.....	47
4.7 Análise estatística.....	47
4.8 Aspectos éticos.....	47
5. RESULTADOS.....	48
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO.....	71

1. Introdução

Dor pélvica crônica é um problema de saúde pública. A prevalência geral estimada é de 3,8% em mulheres (superior à enxaqueca, asma e dor nas costas) (Zondervan, Yudkin *et al.*, 1999b; a; Zondervan e Barlow, 2000), variando de 14 a 24% em mulheres na idade reprodutiva, com impacto direto na sua vida conjugal, social e profissional. Não sabemos sua real prevalência em países em desenvolvimento, como o Brasil, mas estima-se que seja superior àquela encontrada em países desenvolvidos (Latthe, Latthe *et al.*, 2006). Em recente estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, a prevalência de DPC em Ribeirão Preto ficou em torno de 11,5% das mulheres. Se separarmos apenas aquelas no menacme, esses valores giram em torno de 15,1% (resultados ainda não publicados). Tem um custo direto e indireto, incluindo gastos médicos, exames laboratoriais, redução de produtividade, estimado em 39 bilhões de dólares por ano (Mathias, Kuppermann *et al.*, 1996; Parker, Leondires *et al.*, 2006) e é responsável por 40% a 50% das laparoscopias ginecológicas (no nosso serviço essa taxa se encontra entre 10% e 15%), cerca de 10% das consultas ginecológicas e 12% de todas as histerectomias realizadas (Howard, 1993; Broder, Kanouse *et al.*, 2000; Gambone, Mittman *et al.*, 2002). Apesar de não haver um consenso, a dor pélvica crônica (DPC) é definida, mais comumente, como dor pélvica não menstrual, com duração de pelo menos 6 meses suficientemente severa para interferir com as atividades habituais, e que necessita de tratamento clínico e/ ou cirúrgico (Howard, 1993). A etiologia não é clara e, usualmente, resulta de uma complexa interação entre os sistemas gastrintestinal, urinário, ginecológico, músculo-esquelético, neurológico, psicológico e endócrino, influenciado ainda por fatores socioculturais (Howard, 2003). As estratégias atuais de tratamento freqüentemente resultam em insucessos, o que é frustrante para a paciente e para o profissional de saúde. Investigações sobre a fisiopatologia da doença são fundamentais para a proposição de medidas terapêuticas mais eficazes e seguimento clínico mais objetivo.

1.1 Fisiopatologia

Vários são os mecanismos que corroboram para a manutenção e/ ou evolução da dor pélvica crônica. Entre eles podemos citar: 1) mudanças neuroplásticas que ocorrem no corno posterior da medula espinhal em consequência de mudanças eletrofisiológicas, bioquímicas e metabólicas promovidas pelo estímulo nocivo inicial; o que leva à inflamação neurológica devido à liberação, dentre outros, de fator de crescimento neural e substância P na periferia, local de origem do estímulo, exacerbando o mesmo; 2) Sensibilidade cruzada entre vísceras que compartilham uma mesma inervação (reflexo víscero-visceral); e 3) desenvolvimento de um reflexo víscero-muscular que pode culminar não só em repercussões disfuncionais como dificuldade miccional, incontinência urinária, mas também no desenvolvimento de síndrome miofascial e geração de novos pontos de dor (Butrick, 2003). Conseqüentemente, há uma sobreposição de sintomas como dispareunia, dismenorréia, queixas gastrintestinais, geniturinárias e músculo-esqueléticas.

1.2 Dor como evento inflamatório

Até recentemente, as teorias usadas para explicar a origem da dor eram baseadas na sintomatologia, marcadores genéticos, autoanticorpos, etc. Não havia uma regra geral que pudesse ser usada para diferentes entidades que unificasse as teorias em uma só. Omoigui propôs uma nova teoria na qual se tem a dor como evento inflamatório, ou seja, toda a origem da dor seria proveniente da inflamação e da resposta inflamatória gerada por cada entidade patológica (Omoigui, 2007b; a). Atualmente, o tratamento de doenças que se expressam com dor crônica, como por exemplo, artrite, dor lombar, cistite intersticial, fibromialgia, migrânea, ainda tem como alvo central um único mediador inflamatório, geralmente uma prostaglandina. O fenômeno inflamatório caracteriza-se por uma “sopa” de mediadores bioquímicos que estão presentes em todas as síndromes dolorosas. É por isso que se faz necessário o conhecimento

do perfil inflamatório de cada síndrome dolorosa a fim de propor um tratamento individualizado e com uma melhor resposta. Na DPC em mulheres ainda não encontramos esse perfil inflamatório na literatura.

1.3 O papel da inflamação neurogênica

Atualmente vem sendo dada ênfase ao papel da inflamação neurogênica na fisiopatologia da dor pélvica crônica (Wesselmann, 2001). Para embasar essa hipótese parte-se do princípio, universalmente aceito, que estímulos nocivos, por dano tecidual, podem aumentar a produção de substâncias promotoras de dor que estão presentes nas terminações dos nociceptores aferentes primários e são liberadas quando o nociceptor é estimulado. Por outro lado, quando uma fibra sensitiva é estimulada eletricamente o impulso caminha não só em direção à medula espinhal (sentido ortodrômico), mas também no sentido inverso, para a periferia (sentido anti-drômico). Quando esse estímulo anti-drômico chega à periferia, há liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO), substância P, CGRP (proteína relacionada ao gene da calcitonina), neuroquinina A e B, dentre outros. Esses elementos são os mediadores da inflamação neurogênica, caracterizada por vasodilatação, edema, e hiperalgesia (Wesselmann, 2001). Isso gera mais lesão tecidual o que fecha o ciclo e faz o estímulo doloroso perpetuar. Por sua vez, as células inflamatórias podem exercer algumas de suas atividades pela liberação de enzimas degradativas no espaço extracelular. Entre o grupo dessas enzimas, as metaloproteinases se destacam por serem moléculas-chaves no remodelamento da matrix extracelular (Le, Xue *et al.*, 2007).

Esse mecanismo permite interpretar que a dor pélvica crônica tem, ao menos em parte, um componente inflamatório crônico importante. Neste momento temos interesse na avaliação do papel do óxido nítrico como mediador primário do processo inflamatório e do papel das metaloproteinases e seus mecanismos reguladores como eventos secundários à lesão tecidual, por sua vez, decorrente do processo inflamatório.

1.4 Óxido nítrico e inflamação

É cada vez mais evidente que o NO é um importante modulador da cascata inflamatória. Tanto nos transtornos inflamatórios agudos como nos crônicos, o NO tem influência sobre diversos processos fisiopatológicos como a interação leucócito-endotélio, a infiltração de leucócitos ativados nos sítios inflamatórios, dentre outros.

1.5 Associação entre óxido nítrico e doenças associadas à dor pélvica crônica

É amplo o conhecimento da associação entre dor pélvica crônica e algumas doenças, como: síndrome do intestino irritável (Longstreth, 1994; Walker, Gelfand *et al.*, 1996), cistite intersticial (Butrick, 2003), endometriose (Whiteside e Falcone, 2003; Berkley, Rapkin *et al.*, 2005; Fauconnier e Chapron, 2005), depressão (Walker, Sullivan *et al.*, 1993; Lorencatto, Petta *et al.*, 2006) e doenças músculo-esqueléticas (Prendergast e Weiss, 2003; Tu, As-Sanie *et al.*, 2005b; a; 2006). Interessantemente, o óxido nítrico também está associado à maioria dessas doenças e, provavelmente, tem um papel importante na respectiva fisiopatologia dessas situações.

O NO pode estar envolvido na fisiopatologia da hipersensibilidade visceral em pacientes com síndrome do cólon irritável, uma vez que o uso de inibidores seletivos das NOS melhoraram os sintomas dos pacientes (Kuiken, Klooker *et al.*, 2006), embora não pareça ter papel relevante na sensação ou tônus retal normal. Na cistite intersticial, a presença de óxido nítrico intra-vesical permite não só mensurar a inflamação, mas também avaliar objetivamente a resposta ao tratamento individual, o que o torna um marcador útil no manejo da cistite intersticial clássica (Hosseini, Ehren *et al.*, 2004). Com relação à endometriose, grandes quantidades de NO e NOS estão presentes no tecido endometrial de mulheres com endometriose, implicando um possível papel para o NO na patogênese da endometriose (Wu, Chao *et al.*, 2003). O iNOS é a isoforma predominante em fagócitos mononucleares, como os

monócitos e os macrófagos. Essa isoforma é capaz de produzir grandes quantidades de NO, fazendo com que haja uma atividade pró-inflamatória importante. Em mulheres inférteis com endometriose, os macrófagos peritoneais expressam maiores níveis de iNOS e produzem maiores quantidades de NO (Osborn, Haney *et al.*, 2002), justificando sua elevada concentração em fluido peritoneal de mulheres com endometriose e seu ambiente pró-inflamatório (Dong, Shi *et al.*, 2001). Estudos mostram que os níveis séricos de NO, especialmente de nitratos, estão elevados em pacientes com depressão (Suzuki, Yagi *et al.*, 2001) e que inibidores de NOS tem um papel antidepressivo em animais (Karolewicz, Bruce *et al.*, 1999). Além disso, está associado à fisiopatologia de outras doenças, como a doença celíaca, a artrite reumatóide e a doença inflamatória intestinal que possuem um componente inflamatório importante (Rueda, Lopez-Nevot *et al.*, 2002; Gonzalez-Gay, Llorca *et al.*, 2004; Tajouri, Martin *et al.*, 2004; Oliver, Gomez-Garcia *et al.*, 2006) ou aquelas com mecanismos mantenedores e perpetuadores de dor semelhante à dor pélvica crônica, como a dor nas costas ou lombalgia crônica (Sprott, Gay *et al.*, 2006) e dor orofacial crônica (Gratt e Anbar, 2005).

1.6 Evidências da associação entre óxido nítrico e dor pélvica crônica

Há alguns anos o papel do óxido nítrico (NO) em vários processos biológicos e fisiopatológicos vem sendo estudado, desde a biologia tumoral até a transmissão neuronal, inclusive o seu papel na inflamação crônica (Laroux, Pavlick *et al.*, 2001). O NO é um radical livre gasoso, lipossolúvel, produzido pela conversão de L-arginina a L-citrulina por uma classe de enzimas denominadas óxido nítrico sintetases (NOS) (Moncada e Higgs, 1993). Existem três isoformas de NOS: a neuronal (nNOS), presente no cérebro e no sistema intestinal; a endotelial (eNOS), presente nas células endoteliais e a induzida (iNOS) que, como o nome diz, tem produção induzida por diversos mecanismos, incluindo estímulos inflamatórios (Moncada, 1997; Murad, 1998). As duas primeiras, em geral, produzem

pequenas quantidades, benéficas, de óxido nítrico, mas a iNOS pode produzi-lo em grande quantidade e por tempo prolongado (Gratt e Anbar, 2005). Há evidências significativas que associam diretamente o óxido nítrico ao desenvolvimento e à manutenção da nocicepção. Sabe-se que o óxido nítrico aumenta a sensibilidade de nociceptores periféricos (Coutaux, Adam *et al.*, 2005) e os inibidores de iNOS têm efeito analgésico na dor neuropática e inflamatória (De Alba, Clayton *et al.*, 2006). A associação entre óxido nítrico, nocicepção e inflamação crônica, embasa nossa hipótese que o óxido nítrico possa ter um papel na fisiopatologia da dor pélvica crônica em mulheres.

1.7 Metaloproteinases e inflamação tecidual

As metaloproteinases de matrix (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependentes, secretadas como pró-enzimas, que degradam a matrix extracelular (MEC). Há várias décadas tem sido claramente demonstrado que as MMPs são moléculas-chaves associadas com o remodelamento da MEC, o qual é importante em uma série de processos fisiológicos e patológicos (Birkedal-Hansen, 1995). Sua atividade é controlada pela regulação transcricional, ativação da pró-enzima e inibição por inibidores teciduais específicos de MMPs (TIMPs) (Bode, Fernandez-Catalan *et al.*, 1999). A identificação de novos substratos para as MMPs fora da matrix extracelular envolvidos na inflamação, ressaltaram os diversos papéis das MMPs. Estas enzimas podem aumentar a invasão leucocitária e regular a atividade inflamatória de proteases, citocinas e quimocinas. Interessantemente, os membros da família MMP parecem ter uma “personalidade dupla”, no qual as MMPs podem favorecer tanto a ação anti como pró-inflamatória (Le, Xue *et al.*, 2007).

Vários estudos mostram que a interação entre as MMPs e TIMPs (inibidores teciduais das MMPs) é a responsável pela modulação do processo inflamatório, inclusive em doenças inflamatórias neuromusculares (Kato, Hirano *et al.*, 2002; Matache, Stefanescu *et*

al., 2003; Gardner, Borgmann *et al.*, 2006; Hurnaus, Mueller-Felber *et al.*, 2006), a qual guarda estreita relação com a dor pélvica crônica, como descrito nos itens acima. Modelos animais de indução de inflamação crônica têm observado aumento dos níveis séricos e locais de MMP-2 (uma colagenase tipo IV com 72 kDa, inibida pela TIMP-2, e sintetizada basicamente por células mesenquimais como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais e endoteliais) e MMP-9 (uma colagenase tipo IV com 92kDa, inibida pela TIMP-1, e produzida por células inflamatórias como monócitos/ macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) (Corbel, Theret *et al.*, 2001; Corbel, Belleguic *et al.*, 2002; Lanchou, Corbel *et al.*, 2003). Apesar dessas evidências, não há estudos evidenciando o papel das MMPs com dor pélvica crônica.

1.8 Associação entre MMPs e doenças associadas à dor pélvica crônica

Alguns estudos têm observado maior atividade proteolítica das MMPs, juntamente com uma redução da expressão de seus inibidores específicos (TIMPs) no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (Szamatowicz, Laudanski *et al.*, 2002; Collette, Bellehumeur *et al.*, 2004; Collette, Maheux *et al.*, 2006). Por outro lado, a gravidade da lesão da endometriose está associada à redução da capacidade fagocitária dos macrófagos definida pela redução da atividade da MMP-9 expressada por eles, independente da atividade do TIMP-1 (Wu, Shoji *et al.*, 2005). Também há estudos apontando relação significativa das MMPs/ TIMPs com síndromes inflamatórias intestinais (Baugh, Perry *et al.*, 1999; Louis, Ribbens *et al.*, 2000; Mckaig, Mcwilliams *et al.*, 2003) e aderências peritoniais (Chegini, Kotseos *et al.*, 2001; Chegini, 2002; Cheong, Shelton *et al.*, 2003), que por sua vez são causas importantes de dor pélvica crônica.

Acreditamos que a expressão de MMP-2 e MMP-9 esteja relacionada ao processo de remodelamento da MEC conseqüente à injúria inflamatória presente na dor pélvica crônica, independente da causa primária.

2. Justificativa

A dor pélvica crônica é uma doença de alta prevalência, causada por uma heterogeneidade de doenças outras, cujo tratamento clínico e/ ou cirúrgico adequado, muitas vezes não culmina em remissão dos sintomas. Além disso, os custos financeiros para pacientes e promotores de saúde são bastante elevados. Acreditamos que a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos imbricados na gênese, manutenção e perpetuação da doença trará informações essenciais para o delineamento de melhores estratégias de tratamento para a dor pélvica crônica. Particularmente, acreditamos que, se confirmar a associação entre NO com dor pélvica crônica, novos caminhos para a terapêutica serão abertos, especialmente àquelas pacientes não-respondedoras ao tratamento habitual de sua doença primária ou àquelas sem doença primária identificável. Como a endometriose é a principal causa ginecológica de DPC e as metaloproteinases parecem estar envolvidas no crescimento de implantes endometriais, entendemos que se conseguirmos demonstrar uma relação entre DPC e a expressão plasmática das metaloproteinases, poderemos ter um novo alento para o seguimento de pacientes com essa patologia.

3. Objetivos

Quantificar os níveis de NO, MMP-2 e MMP-9 no plasma de mulheres com dor pélvica crônica;

Verificar a correlação entre os níveis plasmáticos de NO, MMP-2 e MMP-9 com a duração e a intensidade dos sintomas de dor;

Verificar a associação dos níveis plasmáticos de NO, MMP-2 e MMP-9 com as causas imputadas de dor pélvica crônica (endometriose e síndrome miofascial).

4. Casuística e Métodos

4.1 Casuística

Foi realizado um estudo incluindo mulheres de uma série prospectiva de março de 2008 a novembro de 2009 junto ao Ambulatório de dor pélvica crônica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo e no Ambulatório de Dor Pélvica Crônica do Centro de Saúde Escola Prof. Dr. Joel Domingos Machado (CSE – Cuiabá), localizado no Distrito Oeste (Sumarezinho) da cidade de Ribeirão Preto-SP, sob a responsabilidade da FMRP-USP. Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRPUSP sob o nº 0112.0.004.000-07, e todas as mulheres que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participarem do projeto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Sessenta e quatro pacientes (37 pacientes com DPC e 27 pacientes sem queixas ginecológicas compatíveis com DPC) preencheram os critérios de inclusão no período do estudo.

4.1.1 Casos

Foram incluídas mulheres com dor pélvica crônica definida como uma dor constante, em região hipogástrica, com uma duração mínima de seis meses, suficientemente severa para interferir com as atividades habituais, e que necessita de tratamento clínico e/ ou cirúrgico. Não foi considerado dor pélvica crônica, casos de dores exclusivamente associadas ao ciclo menstrual, relação sexual ou mulheres que estiveram grávidas no último período de um ano.

4.1.2 Controles

Mulheres saudáveis atendidas pelo setor de ginecologia no Centro Médico Social e Comunitário de Vila Lobato (assistência primária à saúde) e que fizeram coleta de sangue para outros exames da sua rotina.

4.2 Critérios de inclusão

4.2.1 Casos

- Diagnóstico de dor pélvica crônica.
- Concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2.2 Controles

- Mulheres saudáveis que aceitaram participar do estudo e que estiveram de acordo com os termos do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Critérios de exclusão

- Mulheres com diagnóstico de osteoartrite, artrite reumatóide, asma, lúpus, trauma agudo ou cirurgia a menos de 3 meses, câncer, gravidez, hipertensão ou qualquer outra doença sistêmica que tenha um componente inflamatório crônico significativo;
- Mulheres usuárias de contraceptivos orais nos últimos 3 meses.
- Uso de medicamentos analgésicos ou anti-inflamatórios nas últimas 72h
- Tabagismo ou uso de drogas ou cafeína
- Prática de atividade física em nível competitivo

4.4 Métodos

4.4.1 Modelo de Estudo

Estudo observacional tipo caso-controle com pareamento por idade e atividade física.

4.4.2 Variáveis do Estudo

- Idade: número de anos completos.
- Dor pélvica crônica: presença ou ausência.
- Tempo de dor: em meses.
- Intensidade da dor: avaliada pela escala visual analógica de dor, escala de categoria numérica e questionário McGill de dor.
- Causa primária da dor pélvica crônica.
- Dismenorréia: presença ou ausência.
- Dispareunia: presença ou ausência.
- Impacto da dismenorréia e/ ou dispareunia nas atividades diárias: leve, moderada ou severa.
- N°. de gestações.
- N°. de partos.
- N°. de abortos.
- N°. de cesárias.
- N°. de fórceps.
- Epsiotomia prévia.
- Cirurgias na região inferior do abdome.
- Hemograma.
- Níveis sanguíneos de nitratos.
- Níveis sanguíneos de MMP-2.
- Níveis sanguíneos de MMP-9.

4.4.3 Mensuração clínica da dor

Os instrumentos que foram utilizados nesta etapa já foram validados e são aplicáveis tanto em pesquisa científica quanto na clínica aplicada. A mensuração clínica da dor foi realizada através de uma escala unidimensional e uma escala multidimensional (Ong e Seymour, 2004):

4.4.3.1 Unidimensional

- **Escala analógica visual de dor**

Consta de uma linha ininterrupta de 10cm de extensão na qual a paciente é orientada a marcar o ponto que corresponde à dor referida, lembrando que o início da escala (0) corresponde à ausência de dor e o término da escala (10) corresponde à pior dor já vivenciada (parto sem analgesia, infarto do miocárdio, dor de dente, litíase urinária) ou imaginada. Tem como vantagem a simplicidade, é amplamente utilizada independente do idioma, compreensível pela maioria dos pacientes.

Ausência
de dor

Pior dor
vivenciada

4.4.3.2 Multidimensional

- **Questionário McGill de dor**

Considerado o melhor instrumento e o mais utilizado para caracterizar e discernir os componentes afetivo, sensitivo e avaliativo da dor, quando se pretende obter informações qualitativas e quantitativas a partir de descrições verbais. É considerado um instrumento universal, capaz de padronizar a linguagem da dor.

Consta de um questionário com 78 descritores de dor, agrupados em 4 classes (sensorial, afetivo, avaliativo e miscelânea) e 16 subclasses.

4.4.3.3 Outras

A presença e severidade da dismenorréia foram avaliadas através de um sistema multidimensional destacando o impacto social dos sintomas dolorosos. Este método descreve a dor conforme a limitação da capacidade de trabalho, a coexistência de sintomas sistêmicos e a necessidade do uso de analgésicos (Andersch e Milsom, 1982):

0 = Ausente;

1 = Leve: Desconforto pélvico ocasional que não prejudica a atividade diária, uso eventual de medicação;

2 = Moderada: Dor durante grande parte do ciclo, afeta a atividade diária, responsiva ao uso de medicação;

3 = Severa: Dor persistente por todo o ciclo, com limitação importante da atividade diária, uso freqüente de analgésicos potentes, sem resposta efetiva.

A presença e severidade da dispareunia profunda serão avaliadas através de uma escala que caracteriza a dor de acordo com a limitação da atividade sexual (Biberoglu e Behrman, 1981) da seguinte maneira:

0 = Ausente;

1 = Leve: Dor tolerável, não leva à interrupção da relação sexual;

2 = Moderada: Dor intensa o suficiente para levar à interrupção da relação sexual;

3 = Severa: Dor que impede a relação sexual.

4.5 Operacionalização

4.5.1 Instrumento para coleta de informações – formulário

Todas as mulheres com o diagnóstico de dor pélvica crônica foram atendidas pela equipe médica das instituições lotadas acima e submetidas à entrevista e exame físico que segue formulário padronizado e adotado pelo Setor de vídeo-endoscopia do Depto. de Ginecologia e Obstetrícia do HC-FMRP-USP.

4.5.2 Coleta do sangue

A coleta do sangue foi realizada após a consulta médica (ou no dia que a paciente retornou para colher sangue para eventuais exames solicitados na consulta e essenciais para esclarecimento diagnóstico) por um dos pesquisadores envolvidos utilizando seringa e agulha descartáveis. A partir dessa coleta foram realizadas as dosagens de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, glóbulos brancos e contagem diferencial. Foi armazenado em frasco próprio com anticoagulante, processado imediatamente no local para separação do plasma e armazenado em freezer, a -70C para mensuração futura.

- Foi solicitado a todas as mulheres do estudo que não usassem medicamentos antiinflamatórios durante as 72 horas que antecederem a coleta do sangue (Gratt e Anbar, 2005) e que estivessem em jejum de 12 horas.

4.5.3 Determinação das concentrações plasmáticas de nitratos (Metzger, Souza-Costa *et al.*, 2005; Nagasaki, Sertorio *et al.*, 2006)

Os níveis plasmáticos de espécies relacionadas ao NO refletem a atividade da NOS. O NO participa de várias e complexas reações químicas no organismo. Sua curta meia-vida e as suas pequenas concentrações dificultam a avaliação quantitativa da produção in vivo de

NO pelos tecidos. Por este motivo, quantificações de espécies relacionadas ao NO têm sido usadas para avaliar a produção de NO. Entre elas, as concentrações plasmáticas dos principais produtos da oxidação do NO (nitritos e nitratos) são mais comumente utilizadas. Os nitritos derivam da reação do NO com oxigênio em solução e são biologicamente ativos. É um componente instável com dosagens muito inferiores aos nitratos. Em virtude disso não foi dosado no presente estudo. Os nitratos, que são biologicamente inativos, são produzidos através da oxidação dos nitritos pela oxihemoglobina nas hemácias. Medidas destes produtos do NO após 12 horas de jejum refletem a produção endógena de NO, independentemente de fatores dietéticos.

As concentrações de espécies relacionadas ao NO em líquidos foram medidas, sempre em triplicata, pelo método da quimioluminescência, que é um dos métodos mais simples, sensíveis e precisos disponíveis para medir NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol.

Resumidamente, a medida das concentrações de produtos da oxidação de NO (nitritos e nitratos) em amostras líquidas requer que estes produtos da oxidação do NO sejam reduzidos a NO (gás). As quantidades de NO produzidas são medidas após reação do NO com ozônio numa câmara do analisador de NO. Nesta câmara, a reação do NO com ozônio cria moléculas de NO₂ que, no seu estado excitado, emitem luz proporcionalmente às quantidades de NO liberado pela amostra. O analisador contém um detector de luz que transforma o sinal luminoso em sinal elétrico, que é finalmente convertido em sinal analógico e registrado.

Determinação da concentração de nitratos: A concentração plasmática de nitratos é medida de forma idêntica à descrita no item anterior, com a diferença de que a solução redutora é aquecida a 90°C e composta de 3 mL de Vanádio (III) a 0.1 M e 3 mL de HCl a 1M. Esta solução reduz os nitratos e nitritos presentes na amostra a gás NO. Portanto, a

concentração real de nitratos corresponde à diferença entre a concentração medida com a solução de Vanádio (nitratos e nitritos) e a concentração medida no item anterior (somente nitritos).

4.5.4 Determinação das atividades plasmáticas de MMP-2 e MMP-9 (Gerlach, Uzuelli *et al.*, 2005; Souza-Tarla, Uzuelli *et al.*, 2005; Martinez, Lopes *et al.*, 2006)

A atividade das MMP-2 e MMP-9 no plasma foram determinadas pelo método da zimografia, que consiste em uma eletroforese das amostras em um sistema SDS/PAGE que inclui o substrato da enzima (gelatina) no gel de separação, de modo a permitir a evidenciação e quantificação da atividade da enzima. Um microlitro de plasma, tratado com tampão de amostra não-redutor, será utilizado para eletroforese. As enzimas das amostras tratadas foram separadas por eletroforese em um sistema descontínuo de tampões, conforme a técnica de SDS-PAGE descrita por Laemmli, em géis de poliacrilamida na concentração de 12%, contendo gelatina (substrato enzimático) na concentração de 1%, preparados no próprio laboratório.

Após a corrida, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 (a 2%, em água) para remover o SDS e, em seguida, permaneceram submersos durante 16 horas em solução de Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4, contendo CaCl₂ a 10 mM, à temperatura de 37°C. Em seguida, os géis foram fixados e corados com solução de Coomassie Blue (metanol a 50%, ácido acético a 5% e Coomassie Blue G-250 a 0,5%, em água) por 3 horas, sendo então descorados até a visualização das bandas características de atividade de MMPs: bandas claras contra um fundo azul escuro, devido à coloração da gelatina incorporada ao gel e ausência de coloração nos locais onde houve degradação de gelatina.

A quantificação da atividade gelatinolítica foi realizada através de densitometria das bandas e comparação entre a presença da forma ativa (menor massa molecular) e a forma

inativa (maior massa molecular) das enzimas. Dessa maneira, podemos comparar a atividade total das gelatinases entre os diferentes grupos e, ainda, comparar em quais amostras houve predomínio das formas ativas das gelatinases no plasma. Resultados das análises densitométricas de três corridas de uma mesma amostra (em géis diferentes, corridos em dias diferentes) foram utilizados para a obtenção da atividade enzimática média daquela amostra, valor que foi plotado em gráfico e comparado com outras amostras.

4.6 Banco de dados

Os dados obtidos foram registrados e transferidos para o banco de dados eletrônico. A confecção do banco de dados e das planilhas para a análise estatística, tabelas e gráficos foram realizadas com auxílio do aplicativo FileMaker Pro 8 Advanced. O aplicativo Microsoft Word® versão 7.0 foi o editor de texto. Os dados de identificação pessoal foram codificados e mantidos sob sigilo.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a ajuda do programa GraphPad Prism (Prism 5, 2007) for Windows.

4.8 Aspectos éticos

Os princípios de confiabilidade dos dados obtidos, manutenção da autonomia dos participantes, sigilo à identificação pessoal e beneficência/ não-maleficência dos propósitos foram respeitados. O projeto somente foi iniciado após aprovação pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC da FMRPUSP.

5. Resultados

As caracterização da casuística está apresentada na Tabela 1.

Os níveis plasmáticos de NO foram maiores nas pacientes com DPC quando comparadas às pacientes do grupo controle (16.8 ± 7.9 versus 12.2 ± 2.4 , respectivamente) ($P = 0.0016$) (Gráfico 2). Especificamente, os níveis plasmáticos de NO foram maiores nas pacientes com DPC de origem visceral ou peritoneal quando comparadas às pacientes com dor exclusivamente somática ou aos controles saudáveis (19.2 ± 8.9 versus 12.4 ± 1.8 versus 12.2 ± 2.4 , respectivamente) ($P=0.0001$) (Gráfico 3). Não observamos uma correlação entre os níveis plasmáticos de NO e a duração dos sintomas (em meses) (Spearman $r = 0.04$, 95%CI:-0.34 to 0.40, $P = 0.84$) ou com a intensidade dos sintomas avaliado pela EAV (Spearman $r = -0.18$, 95%CI:-0.52 to 0.20, $P=0.34$), ou inventário McGill (Spearman $r = -0.06$, 95%CI:-0.41 to 0.30, $P = 0.72$). Os níveis plasmáticos das MMPs 2 e 9 não diferiram entre as pacientes com DPC e as mulheres saudáveis (1.464 ± 0.1392 versus 1.245 ± 0.1412 e 0.5004 ± 0.3541 versus 0.5571 ± 0.8360 , respectivamente) ($P = 0.2803$ e $P = 0.3769$, respectivamente) (Gráficos 2 e 3).

Tabela 1: Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo

Parâmetros	Controles (n=27)	Casos (n=37)	P
Idade, anos (média \pm DP)	32.0 \pm 1.8	34.7 \pm 1.0	0.22
Paridade (mediana, variância)	1.5, 0-11	1, 0-3	0.19
BDI (mediana, variância)	3, 0-16	11, 0-16	0.08
Duração da dor, meses (mediana, variância)	---	30, 6-120	---
EAV (média \pm DP)	---	81.8 \pm 3.2	---
McGill (média \pm DP)	---	33.8 \pm 2.8	---
Glóbulos vermelhos (média \cdot 10 ⁶ \pm DP)	4.5 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	0.28
Hematócrito (média \pm DP)	40.2 \pm 0.5	40.8 \pm 0.6	0.54
Hemoglobina (média \pm DP)	13.3 \pm 0.2	13.5 \pm 0.2	0.63
Leucócitos (média \cdot 10 ³ \pm DP)	7.1 \pm 0.4	8.0 \pm 0.4	0.18

BDI: inventário de depressão de Beck; EAV: escala analógica visual, em milímetros; DP: desvio padrão da média.

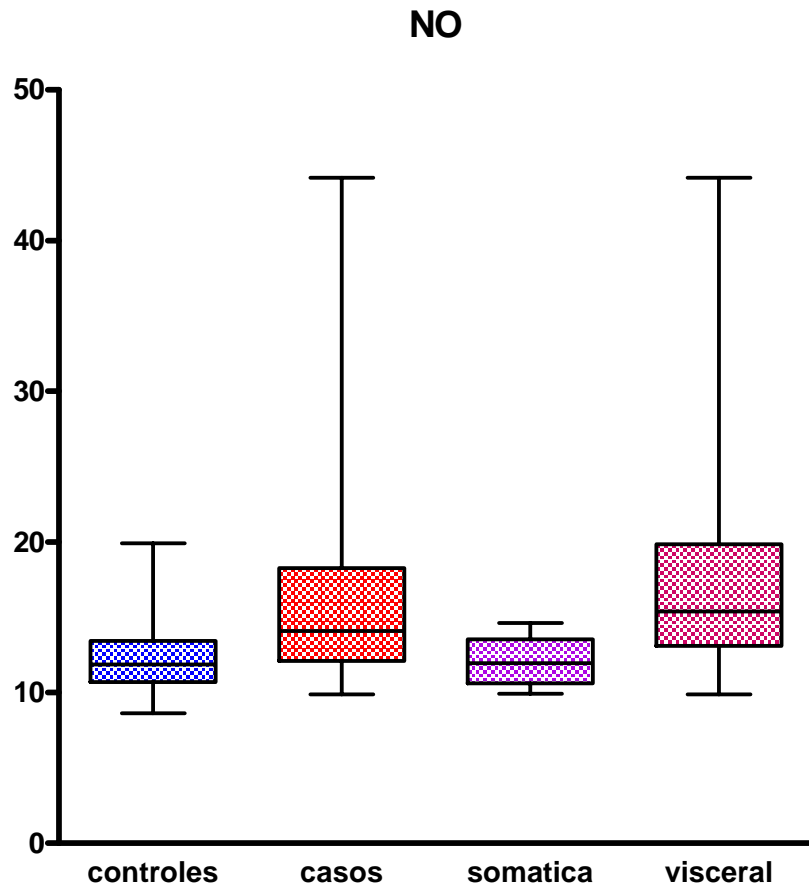


Gráfico 1: Concentração de NO

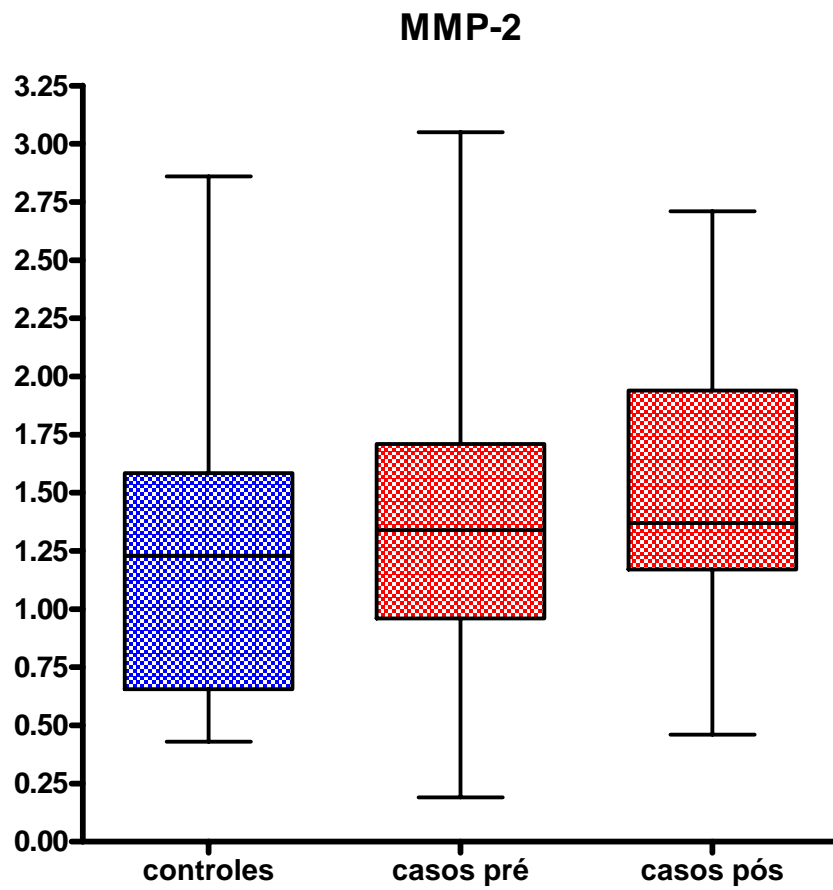


Gráfico 2: Concentração de MMP-2

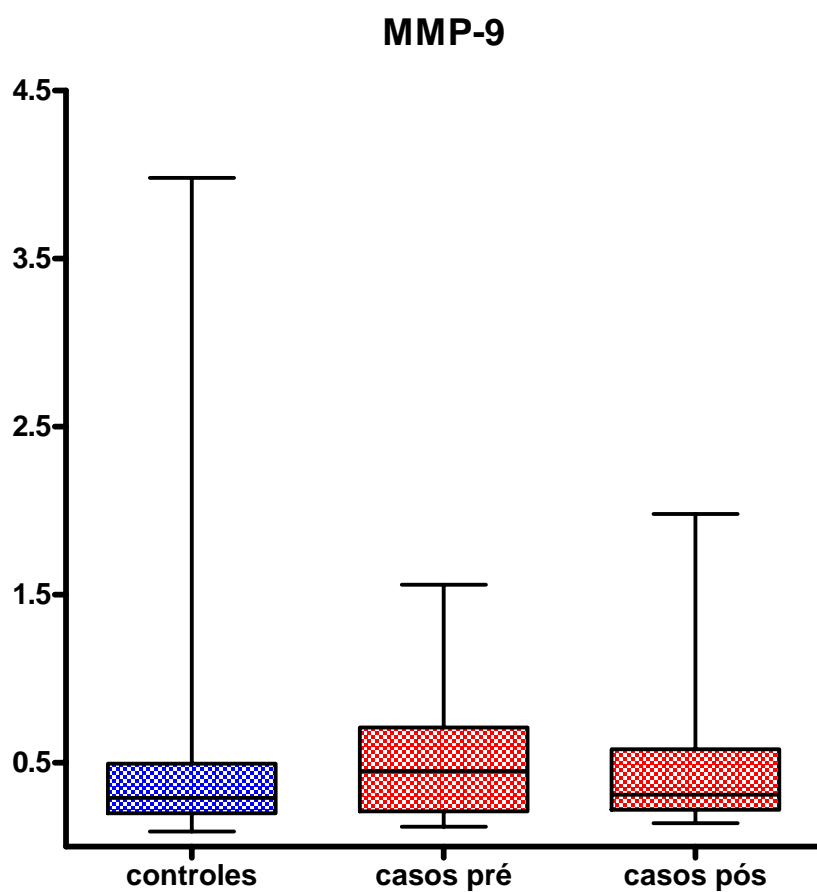


Gráfico 3: Concentração de MMP-9

6. Discussão

A dor pélvica crônica (DPC) ainda se constitui de um grande desafio para os profissionais da área da saúde visto que podemos ter diferentes etiologias e conseqüentemente diferentes tratamentos para a mesma patologia. Esses diferentes órgãos e sistemas, de uma forma ou de outra, levam a um mesmo resultado final, a geração de uma síndrome dolorosa que geralmente compromete a qualidade de vida das pacientes. Omoigui em 2007 propôs uma teoria unificadora, ou “lei da dor”, na qual ele afirma que toda a origem da dor advém da inflamação e/ou da resposta inflamatória (Omoigui, 2007a). Nesse mesmo trabalho, ele afirma que o tratamento das síndromes dolorosas deveriam ser baseadas na determinação do perfil inflamatório da síndrome dolorosa, na inibição ou supressão dos mediadores inflamatórios produzidos naquela síndrome dolorosa por bloqueadores dos mediadores inflamatórios ou por intervenção cirúrgica, quando necessária, na inibição ou supressão da transmissão nervosa, seja no neurônio aferente, seja no neurônio eferente (motor) por drogas anti-convulsivantes ou bloqueio anestésico e por modulação da transmissão neuronal através de opióides (Omoigui, 2007a). Seguindo a mesma linha de raciocínio, resolvemos, ainda que inicialmente, fazer um perfil inflamatório das pacientes com DPC. Apesar de encontrarmos na literatura o perfil inflamatório de algumas patologias que podem levar a quadros álgicos crônicos, como a fibromialgia, a cistite intersticial, a artrite (Omoigui, 2007b), não encontramos estudos que abordem, de uma maneira geral, esse perfil inflamatório independentemente do fator etiológico.

Tem sido repetidamente demonstrado em modelos murinos, que o óxido nítrico aumenta a sensibilidade das regiões nociceptoras periféricas (Steel, Terenghi *et al.*, 1994)(Meller, Cummings *et al.*, 1994)(Wiertelak, Furness *et al.*, 1994) e que os inibidores da NOS agem como substâncias analgésicas (Meller, Dykstra *et al.*, 1994)(Babbedge, Wallace *et al.*, 1993)(Malmberg e Yaksh, 1993)(Bjorkman, 1995). O efeito álgico do NO pode ocorrer tanto a nível espinal quanto a nível periférico. Além disso, injeções intradérmica de NO em

humanos foram capazes de provocar dor em caráter dose-dependente (Wiertelak, Furness *et al.*, 1994)(Meller, Dykstra *et al.*, 1994)(Dickenson, 1995)(Gordh, Karlsten *et al.*, 1995). Isso nos leva a crer que o conhecimento dos níveis de NO em síndromes dolorosas como a DPC pode ser de grande valia no acompanhamento durante o tratamento dessa patologia.

É amplo o conhecimento da associação entre dor pélvica crônica e algumas doenças, como: síndrome do intestino irritável (Longstreth, 1994; Walker, Gelfand *et al.*, 1996), cistite intersticial (Butrick, 2003), endometriose (Whiteside e Falcone, 2003; Berkley, Rapkin *et al.*, 2005; Fauconnier e Chapron, 2005), depressão (Walker, Sullivan *et al.*, 1993; Lorencatto, Petta *et al.*, 2006) e doenças músculo-esqueléticas (Prendergast e Weiss, 2003; Tu, As-Sanie *et al.*, 2005b; a; 2006). Interessantemente, o óxido nítrico também está associado à maioria dessas doenças e, provavelmente, tem um papel importante na respectiva fisiopatologia dessas situações. O NO pode estar envolvido na fisiopatologia da hipersensibilidade visceral em pacientes com síndrome do cólon irritável, uma vez que o uso de inibidores seletivos das NOS melhoraram os sintomas dos pacientes(Kuiken, Klooker *et al.*, 2006), embora não pareça ter papel relevante na sensação ou tônus retal normal. Na cistite intersticial, a presença de óxido nítrico intra-vesical permite não só mensurar a inflamação, mas também avaliar objetivamente a resposta ao tratamento individual, o que o torna um marcador útil no manejo da cistite intersticial clássica (Hosseini, Ehren *et al.*, 2004). Nesse trabalho, os autores fizeram a dosagem de NO usando uma cânula de silicone na bexiga. Através dela, foi infundido cerca de 25 ml de ar ambiente e, 5 minutos após, esse ar foi retirado e levado a um aparelho que analisava a quantidade de NO intravesical. Através desse trabalho, os autores conseguiram descobrir um novo marcador de atividade dessa doença, visto que houve uma correlação significativa entre as mudanças nos sintomas e mudanças na formação de NO nos indivíduos com cistite intersticial clássica. Infelizmente, a dor pélvica crônica apresenta diversos fatores etiológicos. O que torna a dosagem *in locu* dessa substância algo extremamente difícil de ser

realizado. É por isso que a dosagem plasmática do NO torna-se uma nova ferramenta para o acompanhamento das pacientes com DPC. Com relação à endometriose, grandes quantidades de NO e NOS estão presentes no tecido endometrial de mulheres com endometriose, implicando um possível papel para o NO na patogênese da endometriose (Wu, Chao *et al.*, 2003), isso poderia justificar os níveis elevados dessa substância encontrados na corrente sanguínea, uma vez que o NO tem a propriedade de rapidamente se difundir. Mesmo sendo rapidamente destruído pela hemoglobina quando liberado na corrente sanguínea, os níveis de NO mostraram-se bastante elevado nas pacientes com DPC, favorecendo o seu uso como ferramenta para o seguimento das pacientes. Adicionalmente, macrófagos peritoneais de mulheres com endometriose associada à infertilidade expressam maiores níveis de iNOS e produzem maiores quantidades de NO (Osborn, Haney *et al.*, 2002), o que justifica sua elevada concentração em fluido peritoneal de mulheres com endometriose (Dong, Shi *et al.*, 2001). Estudos mostram que os níveis séricos de NO, especialmente de nitratos, estão elevados em pacientes com depressão (Suzuki, Yagi *et al.*, 2001) e que inibidores de NOS tem um papel antidepressivo em animais (Karolewicz, Bruce *et al.*, 1999). Além disso, está associado à fisiopatologia de outras doenças com componente inflamatório importante (Rueda, Lopez-Nevot *et al.*, 2002; Gonzalez-Gay, Llorca *et al.*, 2004; Tajouri, Martin *et al.*, 2004; Oliver, Gomez-Garcia *et al.*, 2006) ou aquelas com mecanismos mantenedores e perpetuadores de dor semelhante à dor pélvica crônica, como a dor nas costas ou lombalgia crônica (Spratt, Gay *et al.*, 2006) e dor orofacial crônica (Gratt e Anbar, 2005). Observou-se neste estudo que os níveis plasmáticos de NO foram maiores nas pacientes com DPC quando comparadas às pacientes do grupo controle (16.8 ± 7.9 versus 12.2 ± 2.4 , respectivamente ($P = 0.0016$)) corroborando com os resultados encontrados na literatura quando diferentes fatores etiológicos eram estudados separadamente. Em termos práticos, isso é de suma importância,

visto que uma dosagem sanguínea é mais fácil e factível de ser realizada rotineiramente que uma amostragem do fluido peritoneal.

Alguns estudos têm observado maior atividade proteolítica das MMPs, juntamente com uma redução da expressão de seus inibidores específicos (TIMPs) no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (Szamatowicz, Laudanski *et al.*, 2002; Collette, Bellehumeur *et al.*, 2004; Collette, Maheux *et al.*, 2006). Por outro lado, a gravidade da lesão da endometriose está associada à redução da capacidade fagocitária dos macrófagos definida pela redução da atividade da MMP-9 expressada por eles, independente da atividade do TIMP-1 (Wu, Shoji *et al.*, 2005). Também há estudos apontando relação significativa das MMPs/ TIMPs com síndromes inflamatórias intestinais (Baugh, Perry *et al.*, 1999; Louis, Ribbens *et al.*, 2000; Mckaig, Mcwilliams *et al.*, 2003) e aderências peritoneais (Chegini, Kotseos *et al.*, 2001; Chegini, 2002; Cheong, Shelton *et al.*, 2003), que por sua vez são causas importantes de dor pélvica crônica. A completa remodelação da matriz extracelular é necessária para que haja o crescimento dos implantes ectópicos e isso se faz com a presença das MMPs. As células do estroma endometrial expressam várias MMPs, incluindo MMP-2 e MMP-9, as quais parecem desempenhar um papel fundamental no desarranjo da matriz extracelular. A expressão alterada dessas proteinases podem levar a um estabelecimento e a uma progressão da endometriose, pois já foi relatado que uma expressão gênica aberrante de MMP-2 e MMP-9 estaria presente em focos eutópicos e ectópicos de endometriose (Hulboy, Rudolph *et al.*, 1997; Chung, Wen *et al.*, 2001; Shaco-Levy, Sharabi *et al.*, 2008; Di Carlo, Bonifacio *et al.*, 2009).

Entre as causas ginecológicas, a endometriose merece atenção especial visto que é a patologia mais prevalente. Diversos mecanismos parecem estar envolvidos na gênese das queixas algícas relacionadas à endometriose, dentre os quais podemos citar as aderências, a extensão das lesões, os micro-sangramentos recorrentes das lesões e, principalmente, o grau

de infiltração das lesões. Este último parece ser o mais bem entendido quando se discute a relação de endometriose e dor pélvica crônica (Fauconnier e Chapron, 2005). Vários autores têm mostrado a relação existente entre as metaloproteinases e endometriose. Essa relação tem sido evidenciada principalmente nos focos de endometriose, existindo poucos estudos que correlacionem com a sua concentração plasmática. Alguns autores demonstraram que as concentrações de metaloproteinases e seus inibidores não podem ser usados como uma ferramenta válida para inferir a severidade da endometriose (Salata, Stojanovic *et al.*, 2008) nos levando a crer que, talvez, não exista uma relação entre os níveis de MMP's no foco primário e no plasma. O nosso estudo verificou que a expressão no plasma não foi diferente entre as pacientes casos e as pacientes do grupo controle, ou seja, as dosagens podem até estar elevadas no local do evento, mas no plasma isso não se verifica. Um outro ponto a ser considerado é que polimorfismos de MMP-2 e MMP-9 parecem estar envolvidos no processo inflamatório da endometriose (Saare, Lamp *et al.*, ; Sillem, Prifti *et al.*, 2001). Isso poderia justificar a ausência de diferença estatística no nosso estudo entre os grupos estudados e os casos controles, necessitando, talvez, que uma dosagem individualizada desses polimórficos fosse realizada. É possível que se consiga identificar um marcador plasmático nas pacientes com DPC, visto que acreditamos que essas substâncias estão, de alguma forma, relacionadas à gênese dessa patologia. Entretanto, as MMP's parecem não conseguir refletir a sua expressão tecidual com os seus níveis plasmáticos.

7. Conclusão

Podemos concluir neste estudo que os níveis plasmáticos de NO estão aumentados em mulheres com Dor Pélvica Crônica quando comparadas àquelas saudáveis. Essa alteração é ainda mais evidente quando a dor é de origem visceral, podendo vir a ser um importante marcador plasmático dessa patologia. Por outro lado, os níveis plasmáticos de metaloproteinases não foram diferentes quando se comparou o grande grupo de DPC com as pacientes controles, mostrando que, apesar das MMPs estarem relacionadas à patogênese de algumas doenças que causam DPC, particularmente endometriose, sua dosagem plasmática não reflete isso. Estudos verificando se existem polimorfismos envolvidos nessa patologia devem ser realizados a fim de checarmos se as MMPs podem também atuar como marcadores plasmáticos na DPC.

8. Referências

- Andersch, B. e I. Milsom. An epidemiologic study of young women with dysmenorrhea. Am J Obstet Gynecol, v.144, n.6, p.655-60. 1982.
- Babbedge, R. C., P. Wallace, *et al.* L-NG-nitro arginine p-nitroanilide (L-NAPNA) is antinociceptive in the mouse. Neuroreport, v.4, n.3, Mar, p.307-10. 1993.
- Baugh, M. D., M. J. Perry, *et al.* Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.117, n.4, p.814-22. 1999.
- Berkley, K. J., A. J. Rapkin, *et al.* The pains of endometriosis. Science, v.308, n.5728, p.1587-9. 2005.
- Biberoglu, K. O. e S. J. Behrman. Dosage aspects of danazol therapy in endometriosis: short-term and long-term effectiveness. Am J Obstet Gynecol, v.139, n.6, p.645-54. 1981.
- Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol, v.7, n.5, p.728-35. 1995.
- Bjorkman, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. Acta Anaesthesiol Scand Suppl, v.103, p.1-44. 1995.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, *et al.* Insights into MMP-TIMP interactions. Ann N Y Acad Sci, v.878, p.73-91. 1999.
- Broder, M. S., D. E. Kanouse, *et al.* The appropriateness of recommendations for hysterectomy. Obstet Gynecol, v.95, n.2, p.199-205. 2000.
- Butrick, C. W. Interstitial cystitis and chronic pelvic pain: new insights in neuropathology, diagnosis, and treatment. Clin Obstet Gynecol, v.46, n.4, p.811-23. 2003.
- Chegini, N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. Front Biosci, v.7, p.e91-115. 2002.
- Chegini, N., K. Kotseos, *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-1) and tissue inhibitor of MMP in peritoneal fluids and sera and correlation with peritoneal adhesions. Fertil Steril, v.76, n.6, p.1207-11. 2001.
- Cheong, Y. C., J. B. Shelton, *et al.* Peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta in women with pelvic adhesions. Fertil Steril, v.79, n.5, p.1168-75. 2003.

- Chung, H. W., Y. Wen, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. Fertil Steril, v.75, n.1, Jan, p.152-9. 2001.
- Collette, T., C. Bellehumeur, *et al.* Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9. Hum Reprod, v.19, n.6, p.1257-64. 2004.
- Collette, T., R. Maheux, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. Hum Reprod, v.21, n.12, p.3059-67. 2006.
- Corbel, M., C. Belleguic, *et al.* Involvement of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the development of airway inflammation and pulmonary fibrosis. Cell Biol Toxicol, v.18, n.1, p.51-61. 2002.
- Corbel, M., N. Theret, *et al.* Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity. Inflamm Res, v.50, n.3, p.129-35. 2001.
- Coutaux, A., F. Adam, *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. Joint Bone Spine, v.72, n.5, p.359-71. 2005.
- De Alba, J., N. M. Clayton, *et al.* GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. Pain, v.120, n.1-2, p.170-81. 2006.
- Di Carlo, C., M. Bonifacio, *et al.* Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. Fertil Steril, v.91, n.6, Jun, p.2315-23. 2009.
- Dickenson, A. H. Central acute pain mechanisms. Ann Med, v.27, n.2, Apr, p.223-7. 1995.
- Dong, M., Y. Shi, *et al.* Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women with idiopathic infertility and endometriosis. J Reprod Med, v.46, n.10, p.887-91. 2001.
- Fauconnier, A. e C. Chapron. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. Hum Reprod Update, v.11, n.6, Nov-Dec, p.595-606. 2005.

- Gambone, J. C., B. S. Mittman, *et al.* Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process. Fertil Steril, v.78, n.5, p.961-72. 2002.
- Gardner, J., K. Borgmann, *et al.* Potential mechanisms for astrocyte-TIMP-1 downregulation in chronic inflammatory diseases. J Neurosci Res, v.83, n.7, p.1281-92. 2006.
- Gerlach, R. F., J. A. Uzuelli, *et al.* Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Anal Biochem, v.344, n.1, p.147-9. 2005.
- Gonzalez-Gay, M. A., J. Llorca, *et al.* Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. Rheumatology (Oxford), v.43, n.9, p.1182-5. 2004.
- Gordh, T., R. Karlsten, *et al.* Intervention with spinal NMDA, adenosine, and NO systems for pain modulation. Ann Med, v.27, n.2, Apr, p.229-34. 1995.
- Gratt, B. M. e M. Anbar. A pilot study of nitric oxide blood levels in patients with chronic orofacial pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.100, n.4, p.441-8. 2005.
- Hosseini, A., I. Ehren, *et al.* Nitric oxide as an objective marker for evaluation of treatment response in patients with classic interstitial cystitis. J Urol, v.172, n.6 Pt 1, p.2261-5. 2004.
- Howard, F. M. The role of laparoscopy in chronic pelvic pain: promise and pitfalls. Obstet Gynecol Surv, v.48, n.6, p.357-87. 1993.
- _____. Chronic pelvic pain. Obstet Gynecol, v.101, n.3, p.594-611. 2003.
- Hulboy, D. L., L. A. Rudolph, *et al.* Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol Hum Reprod, v.3, n.1, Jan, p.27-45. 1997.
- Hurnaus, S., W. Mueller-Felber, *et al.* Serum levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitors in inflammatory neuromuscular disorders. Eur Neurol, v.55, n.4, p.204-8. 2006.
- Karolewicz, B., K. H. Bruce, *et al.* Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 2. Chronic treatment results in downregulation of cortical beta-adrenoceptors. Eur J Pharmacol, v.372, n.3, p.215-20. 1999.

Katoh, N., S. Hirano, *et al.* Increased levels of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 but not metalloproteinase-3 in atopic dermatitis. Clin Exp Immunol, v.127, n.2, p.283-8. 2002.

Kuiken, S. D., T. K. Klooker, *et al.* Possible role of nitric oxide in visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol Motil, v.18, n.2, p.115-22. 2006.

Lanchou, J., M. Corbel, *et al.* Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. Crit Care Med, v.31, n.2, p.536-42. 2003.

Laroux, F. S., K. P. Pavlick, *et al.* Role of nitric oxide in inflammation. Acta Physiol Scand, v.173, n.1, p.113-8. 2001.

Latthe, P., M. Latthe, *et al.* WHO systematic review of prevalence of chronic pelvic pain: a neglected reproductive health morbidity. BMC Public Health, v.6, p.177. 2006.

Le, N. T., M. Xue, *et al.* The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. Front Biosci, v.12, p.1475-87. 2007.

Longstreth, G. F. Irritable bowel syndrome and chronic pelvic pain. Obstet Gynecol Surv, v.49, n.7, p.505-7. 1994.

Lorencatto, C., C. A. Petta, *et al.* Depression in women with endometriosis with and without chronic pelvic pain. Acta Obstet Gynecol Scand, v.85, n.1, p.88-92. 2006.

Louis, E., C. Ribbens, *et al.* Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol, v.120, n.2, p.241-6. 2000.

Malmberg, A. B. e T. L. Yaksh. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. Pain, v.54, n.3, Sep, p.291-300. 1993.

Martinez, M. L., L. F. Lopes, *et al.* Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. J Cardiovasc Pharmacol, v.47, n.1, p.117-22. 2006.

Matache, C., M. Stefanescu, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and its natural inhibitor TIMP-1 expressed or secreted by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun, v.20, n.4, p.323-31. 2003.

Mathias, S. D., M. Kuppermann, *et al.* Chronic pelvic pain: prevalence, health-related quality of life, and economic correlates. Obstet Gynecol, v.87, n.3, p.321-7. 1996.

Mckaign, B. C., D. Mcwilliams, *et al.* Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. Am J Pathol, v.162, n.4, p.1355-60. 2003.

Meller, S. T., C. P. Cummings, *et al.* The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. Neuroscience, v.60, n.2, May, p.367-74. 1994.

Meller, S. T., C. Dykstra, *et al.* The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. Neuropharmacology, v.33, n.11, Nov, p.1471-8. 1994.

Metzger, I. F., D. C. Souza-Costa, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. Pharmacogenet Genomics, v.15, n.8, p.565-70. 2005.

Moncada, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci, v.811, p.60-7; discussion 67-9. 1997.

Moncada, S. e A. Higgs. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med, v.329, n.27, p.2002-12. 1993.

Murad, F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? Recent Prog Horm Res, v.53, p.43-59; discussion 59-60. 1998.

Nagasaki, S., J. T. Sertorio, *et al.* eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. Free Radic Biol Med, v.41, n.7, p.1044-9. 2006.

Oliver, J., M. Gomez-Garcia, *et al.* Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease. Tissue Antigens, v.67, n.4, p.326-30. 2006.

Omoigui, S. The biochemical origin of pain--proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 1 of 3--a unifying law of pain. Med Hypotheses, v.69, n.1, p.70-82. 2007a.

_____. The biochemical origin of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 2 of 3 - inflammatory profile of pain syndromes. Med Hypotheses, v.69, n.6, p.1169-78. 2007b.

- Ong, K. S. e R. A. Seymour. Pain measurement in humans. Surgeon, v.2, n.1, p.15-27. 2004.
- Osborn, B. H., A. F. Haney, *et al.* Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. Fertil Steril, v.77, n.1, p.46-51. 2002.
- Parker, J. D., M. Leondires, *et al.* Persistence of dysmenorrhea and nonmenstrual pain after optimal endometriosis surgery may indicate adenomyosis. Fertil Steril, v.86, n.3, p.711-5. 2006.
- Prendergast, S. A. e J. M. Weiss. Screening for musculoskeletal causes of pelvic pain. Clin Obstet Gynecol, v.46, n.4, p.773-82. 2003.
- Rueda, B., M. A. Lopez-Nevot, *et al.* Polymorphism of the inducible nitric oxide synthase gene in celiac disease. Hum Immunol, v.63, n.11, p.1062-5. 2002.
- Saare, M., M. Lamp, *et al.* Polymorphisms in MMP-2 and MMP-9 promoter regions are associated with endometriosis. Fertil Steril, Jan 23.
- Salata, I. M., N. Stojanovic, *et al.* Gelatinase A (MM-2), gelatinase B (MMP-9) and their inhibitors (TIMP 1, TIMP-2) in serum of women with endometriosis: Significant correlation between MMP-2, MMP-9 and their inhibitors without difference in levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in relation to the severity of endometriosis. Gynecol Endocrinol, v.24, n.6, Jun, p.326-30. 2008.
- Shaco-Levy, R., S. Sharabi, *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.139, n.2, Aug, p.226-32. 2008.
- Sillem, M., S. Prifti, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, v.95, n.2, Apr, p.167-74. 2001.
- Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, *et al.* Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Clin Biochem, v.38, n.5, p.410-4. 2005.
- Sprott, H., R. E. Gay, *et al.* Influence of Ibuprofen-Arginine on Serum Levels of Nitric Oxide Metabolites in Patients with Chronic Low Back Pain - A Single-Blind, Placebo Controlled Pilot Trial (ISRCTN18723747). J Rheumatol, v.33, n.12, p.2515-8. 2006.
- Steel, J. H., G. Terenghi, *et al.* Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. Neurosci Lett, v.169, n.1-2, Mar 14, p.81-4. 1994.

- Suzuki, E., G. Yagi, *et al.* Elevated plasma nitrate levels in depressive states. J Affect Disord, v.63, n.1-3, p.221-4. 2001.
- Szamatowicz, J., P. Laudanski, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1: a possible role in the pathogenesis of endometriosis. Hum Reprod, v.17, n.2, p.284-8. 2002.
- Tajouri, L., V. Martin, *et al.* Investigation of an inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) polymorphism in a multiple sclerosis population. Brain Res Bull, v.64, n.1, p.9-13. 2004.
- Tu, F. F., S. As-Sanie, *et al.* Musculoskeletal causes of chronic pelvic pain: a systematic review of diagnosis: part I. Obstet Gynecol Surv, v.60, n.6, p.379-85. 2005a.
- _____. Musculoskeletal causes of chronic pelvic pain: a systematic review of existing therapies: part II. Obstet Gynecol Surv, v.60, n.7, p.474-83. 2005b.
- _____. Prevalence of pelvic musculoskeletal disorders in a female chronic pelvic pain clinic. J Reprod Med, v.51, n.3, p.185-9. 2006.
- Walker, E. A., A. N. Gelfand, *et al.* Chronic pelvic pain and gynecological symptoms in women with irritable bowel syndrome. J Psychosom Obstet Gynaecol, v.17, n.1, p.39-46. 1996.
- Walker, E. A., M. D. Sullivan, *et al.* Use of antidepressants in the management of women with chronic pelvic pain. Obstet Gynecol Clin North Am, v.20, n.4, p.743-51. 1993.
- Wesselmann, U. Neurogenic inflammation and chronic pelvic pain. World J Urol, v.19, n.3, p.180-5. 2001.
- Whiteside, J. L. e T. Falcone. Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence? Clin Obstet Gynecol, v.46, n.4, p.824-30. 2003.
- Wiertelak, E. P., L. E. Furness, *et al.* Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. Brain Res, v.649, n.1-2, Jun 27, p.19-26. 1994.
- Wu, M. H., Y. Shoji, *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. Am J Pathol, v.167, n.4, p.1061-9. 2005.

Wu, M. Y., K. H. Chao, *et al.* Nitric oxide synthesis is increased in the endometrial tissue of women with endometriosis. Hum Reprod, v.18, n.12, p.2668-71. 2003.

Zondervan, K. e D. H. Barlow. Epidemiology of chronic pelvic pain. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v.14, n.3, p.403-14. 2000.

Zondervan, K. T., P. L. Yudkin, *et al.* Patterns of diagnosis and referral in women consulting for chronic pelvic pain in UK primary care. Br J Obstet Gynaecol, v.106, n.11, p.1156-61. 1999a.

_____. Prevalence and incidence of chronic pelvic pain in primary care: evidence from a national general practice database. Br J Obstet Gynaecol, v.106, n.11, p.1149-55. 1999b.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo ou pelo telefone (16) 3602-2228. Título do Projeto: Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto (16) 3602-2407 / 2311 Pesquisadores participantes: Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira (16) 3602-2589 / 2311 Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis (16) 3602-2589 / 2311 Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (16) 3602-3163

1) Este projeto pretende basicamente estudar alterações de substâncias inflamatórias no sangue e peritônio (fina membrana que reveste o interior da cavidade abdominal e pélvica) relacionadas à dor pélvica crônica. 2) Você poderá participar da primeira e/ ou da segunda etapa do projeto consentindo separadamente ao final desse termo. Sua participação na 1ª etapa será permitir a obtenção de 10ml de sangue na primeira consulta e após 3 e 6 meses de tratamento. Se você consentir, e caso haja necessidade de cirurgia para o diagnóstico ou tratamento da sua doença, sua participação na 2ª etapa será permitir a obtenção de líquido da cavidade peritoneal (presente na maioria das mulheres) e amostra de peritônio de 1x1cm englobando a lesão encontrada durante a cirurgia ou de uma região aleatória da pelve caso não forem localizadas quaisquer lesões. Salientamos que este procedimento não compromete sua recuperação após a cirurgia, não interferirá no tempo para alta hospitalar, e não compromete seu tratamento em quaisquer circunstâncias. Caso você esteja incluída no grupo controle (sem dor pélvica crônica) referente às pacientes que serão submetidas à laparoscopia por outros motivos, informamos que não haverá incisões (cortes) adicionais e que não haverá prolongamento do tempo cirúrgico em mais que 2 ou 3 minutos, nem prolongará sua estadia no hospital ou sua recuperação pós-operatória, tampouco interferirá no resultado da cirurgia principal; 3) Você não terá gastos financeiros adicionais,

pois as avaliações serão feitas no mesmo período de sua consulta médica e/ ou procedimento cirúrgico. 4) Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito à indenização. 5) O projeto não interferirá no tempo para o diagnóstico definitivo da causa do seu problema, tampouco nas eventuais indicações cirúrgicas ou nos tratamentos propostos. 6) Os pesquisadores se comprometem que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de sua participação no projeto, bem como de que lhe será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa. 7) Os resultados da pesquisa serão importantes para entender melhor a doença em questão (dor pélvica crônica) e, certamente trarão informações que podem facilitar o tratamento de mulheres com a doença ou que, futuramente, venham a desenvolvê-la. 8) Você terá a segurança de não ser identificada e ter mantido o caráter confidencial da informação relacionada à sua privacidade. 9) Nos comprometemos a prestar-lhe informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a sua vontade de continuar dele participando. 10) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você. 11) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida aos responsáveis pelo projeto, designados no início deste termo, o que poderá ser realizada no Ambulatório AGDE que ocorre às 6^a feiras no período da manhã no balcão 1 – verde claro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ambulatório de Ginecologia; ou no Ambulatório de dor pélvica crônica do CSE – Cuiabá que ocorre às 4^a feiras no período da manhã; ou ainda pelos telefones de contato informados no início desse termo. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP pode lhe oferecer informações caso você não queira falar com nenhum dos pesquisadores responsáveis por este estudo. Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Mediadores inflamatórios na dor pélvica crônica” , como sujeito. Fui devidamente informada em detalhes pelo(s) pesquisador(es)

responsável(is) no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetida, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização se houver danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar desse estudo. Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____. Se você concordar com a 1ª etapa da pesquisa assine abaixo:

_____ Assinatura do voluntário

_____ Assinatura do investigador/
testemunha

Se você concordar com a 2ª etapa da pesquisa assine abaixo:

_____ Assinatura do voluntário

_____ Assinatura do investigador/
testemunha