

**MARIA LUCIA APARECIDA CARNEVALE MARIN**

**Papel de MICA na endometriose**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia  
Orientadora: Prof. Dra. Verônica Porto Carreiro  
de Vasconcelos Coelho  
Coorientador: Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**MARIA LUCIA APARECIDA CARNEVALE MARIN**

**Papel de MICA na endometriose**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia  
Orientadora: Prof. Dra. Verônica Porto Carreiro  
de Vasconcelos Coelho  
Coorientador: Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marin, Maria Lucia Aparecida Carnevale  
Papel de MICA na endometriose / Maria Lucia  
Aparecida Carnevale Marin. -- São Paulo, 2022.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Alergia e Imunopatologia.  
Orientadora: Veronica Porto Carreiro de  
Vasconcellos Coelho.  
Coorientador: Mauricio Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.MICA 3.MICA  
solúvel 4.NKG2D 5.Células NK 6.Citotoxicidade NK  
7.CD107a 8.Interferon-gama 9.IL-10

USP/FM/DBD-084/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À minha mãe, uma estrela nesse nosso infinito,  
meu maior exemplo e a minha maior inspiração.*

*Ao meu amado Carlos, pelo seu incansável apoio neste meu sonho,  
e pelo carinho, em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu filho Lucas, todo o meu amor.  
Desta minha caminhada, fica a fruto de que não há conquistas sem esforço,  
e que sempre há tempo para sonhar...*

*É muito bom olhar para trás quando se consegue vislumbrar momentos tão felizes...*

*Sozinhos construímos muito pouco. Juntos, os frutos têm um sabor muito especial.*

*Não é sem valor que as pessoas cruzam os nossos caminhos. Algumas por uns poucos momentos, outras por um pouco mais... O que vale é a intensidade com que esses momentos são vividos.*

*A todos, com carinho, o meu muito obrigado.*

A minha querida orientadora, Dra. Verônica Coelho, por sua toda dedicação ao meu aprimoramento científico. Sempre pronta a me orientar, discutir e ensinar, sem nunca medir esforços. Meu muito obrigada pelo carinho e apoio em todos os momentos desta caminhada. Seu incentivo me fez acreditar que sim, era possível! Espero poder retribuir toda essa confiança e ensinamentos adquiridos. Conte sempre comigo!

Ao meu coorientador, Dr. Mauricio Abrão, pelo grande incentivo, apoio e conhecimentos recebidos. Foi a partir do grande projeto Temático em endometriose, por ele idealizado e coordenado, que eu tive a oportunidade de me juntar a sua equipe e descobrir uma nova área de conhecimento e desenvolver este trabalho. Obrigada pela confiança!

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, com quem tenho tido a oportunidade de trabalhar por tantos anos. Obrigada pelo apoio e conhecimentos recebidos, e por sempre acreditar em mim. Espero poder contribuir sempre mais.

À Dra. Luiza Guilherme, Dr. Edécio Cunha-Neto e Dra. Keity Santos pelo incentivo, amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À querida Marici, pela sua parceria, desde o início deste projeto científico. Obrigada por todo apoio técnico e organização de dados, bem como no auxílio na obtenção de material biológico, essenciais para o desenvolvimento deste estudo. Obrigada pelas discussões científicas e auxílio incomparável na revisão deste texto e, principalmente, pela sua amizade, nunca faltando carinho e atenção.

A amiga Sandra Maria, Sandroca, por toda sua orientação, auxílio nos experimentos e discussão de citometria, que foram tão essenciais para mim! Obrigada por seu incansável apoio, por sua amizade e carinho.

A Samar, sempre amiga e acolhedora. Sua amizade tem sido um privilégio para mim. Obrigada por tudo! Poder contar com pessoas tão especiais faz com que tenhamos força para buscarmos nossos objetivos e enfrentarmos as dificuldades que a vida nos apresenta.

Aos amigos da equipe de endometriose, Doutores Giuliano Borrelli, Marina Andres, Sergio Podgaec, Patrick Bellelis, Lidia Myung, Luciano Gibran, Luis Flavio Fernandes, e a

todos os demais que participaram do procedimento cirúrgico, essenciais para a obtenção de material biológico, e desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade e colaboração!

À equipe da citometria, Janinha, Sandra e Dani, pelo apoio e discussões científicas, tão proveitosas, e que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho. Obrigada companheirismo!

As queridas amigas Priscila Ramos, Amanda Cabral e Bianca Natali, pelas orientações iniciais nos experimentos de células NK e citometria de fluxo, e pelas discussões que tanto me ajudaram. Obrigada pela paciência e carinho!

A querida Dra. Lea Demarchi, por todo auxílio na obtenção das imagens de imunohistoquímica. Obrigada pelo apoio e atenção!

A amiga Marta Privato, pela organização e apoio administrativo durante todo o desenvolvimento do Projeto Temático Endometriose, fundamentais para o andamento deste estudo. Pela amizade e incentivo!

À Dra. Mari Sogayar pela disponibilização de reagentes/células, e à Dra. Ana Claudia Carreira pelo estabelecimento da linhagem celular e discussões científicas. Obrigada pelo apoio.

À Dra. Karina Carvalho pela disponibilização do protocolo de atividade NK, e à Dra. Ana Eduarda Carvalho, ambas pela padronização inicial deste protocolo.

A Cadiele Reichert e Debora Levy pelo auxílio na análise estatística da curva ROC. Muito obrigada pelo apoio e disponibilidade!

A todos os meus amigos do laboratório de Imunologia, Selminha, Déia, Elaine, Washington, Simone, Rafael, Raquel, Edil, Soninha, Jair, à toda equipe do HLA, em especial a Clodô, Helcio e Carlos Sergio, à toda equipe da Alergia e OXI, ao querido amigo Leo da imuno, às amigas Fê Alegria, Karen e Ruth, à Karlinha, Giu, Luri e a todos os demais alunos, bem como a tantos outros amigos que certamente falhei em citar... A todos, o meu muito obrigada pelo companheirismo, apoio e alegrias que me proporcionam. Cada um, da sua forma, colaborou para o meu crescimento nesta caminhada.

A querida Eleni, secretária da pós-graduação, pela paciência e apoio que nunca faltaram! Obrigada por toda ajuda!

Obrigada, minha pequena grande Raizinha, onde quer que você esteja! Pelo seu exemplo de alegria e perseverança.

A todas as mulheres participantes deste estudo, que mesmo em seus momentos mais difíceis e de incerteza, acreditaram que a ciência poderia trazer respostas à compreensão da sua doença. Meus sinceros agradecimentos.

### *A minha família...*

A minha mãe, agradeço a vida e todo amor. Seu exemplo de determinação e os ensinamentos que deixou, foram o maior incentivo na busca deste sonho...

Ao meu pai querido, que, dentro de suas dificuldades, nunca mediu esforços para minha formação. Obrigada pelo seu carinho e apoio.

Aos meus queridos irmãos, Francisco Cesar, Rogerio e Ricardo, pelo carinho e incentivo, e pelas alegrias que me fortaleceram nesta caminhada. Desculpem pelos momentos de ausência...É tão bom ter vocês ao meu lado!

As minhas cunhadas Ana e Rode, pelo apoio e amizade de irmãs, e aos meus sobrinhos, Marina, Rafael, Maira e Enzo, pelo carinho e alegrias!

Ao meu sogro, Sr. Danilo, pelo incentivo e carinho de um pai.

### *Aos meus tesouros...*

A você, Cá, meu companheiro de vida, obrigada por todo apoio e carinho que recebi. Você é parte da minha conquista, pois sei que o meu sonho passou a ser o nosso sonho. Obrigada por tudo, sempre e sempre!

Ao meu amado filho Lucas, pelo incentivo e carinho nesta etapa de minha vida. Ter você ao meu lado me fez mais forte. Tenho certeza de que aprendemos muito nesta caminhada....

*A Deus, que guiou meus caminhos e me deu saúde e forças para chegar até aqui.*

*“A ciência se compõe de erros que,  
por sua vez, são os passos até  
a verdade.”*

*Julio Verne*

*“O tempo muito me ensinou:  
Ensinou a amar a vida,  
Não desistir de lutar,  
Renascer na derrota,  
Renunciar às palavras  
e pensamentos negativos,  
Acreditar nos valores humanos,  
e a ser otimista.  
Aprendi que mais vale  
tentar do que recuar...  
Antes acreditar  
do que duvidar,  
Que o que vale na vida,  
Não é o ponto de partida  
e sim a nossa caminhada.”*

*Cora Coralina*

*“Se a gente ri, a gente resiste.  
A alegria é a força que se extrai da vida.”*

*Germano Coelho*

## SUMÁRIO

### Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

### Lista de figuras

### Lista de tabelas

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 Endometriose.....	2
1.1.1 Definição e classificação.....	2
1.1.2 Patogênese, fisiologia e progressão da endometriose.....	4
1.2 Fisiologia do ciclo menstrual e imunobiologia da endometriose.....	6
1.2.1 Fisiologia do ciclo menstrual.....	6
1.2.2 Imunobiologia da endometriose.....	11
1.3 Células <i>Natural Killer</i> na endometriose.....	18
1.4 MICA - <i>Major Histocompatibility Class I Chain-related A</i> .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
<b>3. MÉTODOS</b> .....	37
3.1 Participantes da pesquisa.....	37
3.2 Casuística.....	37
3.3 Dados clínicos e critérios de seleção.....	38
3.4 Material biológico.....	39
3.5 Delineamento do estudo.....	40
3.6 PCR quantitativa em tempo real: expressão gênica de <i>MICA</i> .....	41
3.6.1 Extração de RNA total.....	41
3.6.2 Tratamento com DNase e análise da qualidade do RNA total.....	42
3.6.3 Síntese de cDNA.....	43
3.6.4 Seleção de <i>primers</i> .....	43
3.6.5 Reações de qRT-PCR.....	44
3.7 Imunohistoquímica: expressão proteica de MICA.....	45
3.7.1 Avaliação da expressão proteica de MICA.....	46
3.8 ELISA para pesquisa de MICA solúvel.....	47
3.9 Atividade efetora de células NK.....	48
3.9.1 Análise quantitativa das subpopulações de células NK e expressão do receptor NKG2D e das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10, na condição <i>ex vivo</i> .....	51
3.9.2 Análise da atividade efetora de células NK frente a estímulo com células K562.....	54
3.9.2.1 Cultivo de células K562 e bloqueio da proteína MICA na superfície celular.....	55
3.9.2.2 Análise da expressão de MICA em células K562 pré e pós o bloqueio de MICA.....	56
3.9.2.3 Frequência e intensidade de expressão de moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10, nas subpopulações de células NK.....	57
3.10 Avaliação da atividade citotóxica de células NK.....	60
3.10.1 Marcação das células K562 com CFSE.....	61
3.10.2 Cocultura de PBMC:K562 (E:A) e marcação para morte celular.....	62
3.11 Análise estatística.....	63

<b>4. RESULTADOS</b> .....	66
4.1 Expressão gênica de <i>MICA</i> .....	67
4.2 Expressão proteica de <i>MICA</i> .....	68
4.2.1 Expressão proteica de <i>MICA</i> no epitélio glandular e estroma.....	68
4.2.2 Expressão proteica de <i>MICA</i> em relação à fase do ciclo menstrual.....	73
4.2.3 Expressão proteica de <i>MICA</i> em relação aos estádios da endometriose.....	76
4.2.4 Expressão proteica de <i>MICA</i> na profunda de retossigmóide e retrocervical.....	76
4.3 Pesquisa de <i>MICA</i> solúvel.....	77
4.3.1 Níveis de s <i>MICA</i> no soro e fluido peritoneal em mulheres com endometriose e controles.....	78
4.3.2 Níveis de s <i>MICA</i> nos diferentes estádios da endometriose.....	79
4.3.3 Níveis de s <i>MICA</i> nas diferentes fases do ciclo menstrual.....	81
4.3.4 Níveis de s <i>MICA</i> em relação aos tipos de endometriose.....	83
4.3.5 Níveis de s <i>MICA</i> e expressão gênica de <i>MICA</i> .....	85
4.3.6 Análise de correlação entre os níveis de s <i>MICA</i> e a expressão de <i>MICA in situ</i> .....	86
4.3.7 Pesquisa de nível de s <i>MICA</i> como potencial parâmetro preditivo para a endometriose.....	87
4.4 Células NK e subpopulações: análises quantitativas e funcionais.....	87
4.4.1 Análise quantitativa das subpopulações de células NK e expressão de NKG2D, IFN- $\gamma$ e IL10.....	88
4.4.1.1 Subpopulações NK: na condição <i>ex vivo</i> .....	88
4.4.1.2 Expressão de NKG2D em subpopulações NK: na condição <i>ex vivo</i> .....	91
4.4.1.3 Expressão de moléculas IFN- $\gamma$ e IL-10: na condição <i>ex vivo</i> .....	94
4.4.2 Expressão de moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10 frente a estímulo com células K562.....	96
4.4.2.1 CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10: na condição estado basal da cultura, sem estímulo.....	96
4.4.2.2 Moléculas de atividade NK: na condição com estímulo com células K562.....	105
4.4.2.3 Na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para <i>MICA</i> .....	113
4.4.3 Expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e relação com níveis de <i>MICA</i> solúvel.....	120
4.4.3.1 Moléculas vs <i>MICA</i> solúvel: na condição basal de cultura.....	120
4.4.3.2 Moléculas vs <i>MICA</i> solúvel: na condição de estímulo com células K562.....	121
4.4.3.3 Moléculas vs <i>MICA</i> solúvel: na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para <i>MICA</i> .....	123
4.4.4 Expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e relação com estádios da endometriose.....	127
4.4.4.1 Moléculas vs estádios: na condição basal de cultura.....	127
4.4.4.2 Moléculas vs estádios: na condição de estímulo com células K562.....	131
4.4.4.3 Expressão de moléculas vs estádios: na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para <i>MICA</i> .....	134
4.4.5 Expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10 e relação com às fases do ciclo menstrual.....	141
4.4.5.1 Expressão das moléculas e fases do ciclo: condição basal de cultura.....	141
4.4.5.2 Expressão das moléculas e fases do ciclo: estímulo com células K562.....	142
4.4.5.3 Expressão das moléculas e fase do ciclo: estímulo com células K562 bloqueadas para <i>MICA</i> .....	144
4.4.6 Citotoxicidade pelas células NK.....	149
4.4.6.1 Citotoxicidade contra células K562 sem bloqueio e com bloqueio para <i>MICA</i> .....	149
4.4.6.2 Citotoxicidade e relação com os estádios da endometriose.....	151
4.4.6.3 Citotoxicidade e análise de correlação com níveis de <i>MICA</i> solúvel.....	153

4.4.6.4	Citotoxicidade e relação com as fases do ciclo menstrual.....	153
4.4.6.5	Análise de correlação entre citotoxicidade induzida pelas células NK e a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10.....	157
5.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	161
6.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	186
7.	<b>ANEXOS.....</b>	189
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	249

## LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>ADAM</b>	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i> , desintegrina e metaloproteinase
<b>ADCC</b>	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> , citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>AR</b>	Ácido Retinóico
<b>ASRM</b>	<i>American Society for Reproductive Medicine</i> , Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
<b>AUC</b>	<i>Area Under Curve</i> , área sob a curva
<b>Ac (s)</b>	Anticorpo (s)
<b>bp</b>	<i>base pairs</i> , pares de bases
<b>CAPPesq</b>	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> , DNA complementar
<b>COX 2</b>	<i>Cyclooxygenase (COX)-2</i> , cicloxigenase 2
<b>Ct</b>	<i>Threshold Cycle</i> , ciclo de limiar
<b>CTR</b>	Grupo Controle
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i> , éster succinimidílico da carboxifluoresceína
<b>CCND1</b>	<i>Cyclin D1</i> , ciclina D1
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cells</i> , células dendríticas
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , ácido desoxirribonucleico
<b>DNI</b>	Doença Ginecológica Não Inflamatória
<b>dNTP</b>	<i>deoxynucleoside triphosphate</i> , desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EDT</b>	Endometriose
<b>Ef</b>	Eficiência de amplificação
<b>EIR</b>	Escore de Imunorreatividade
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>ERP5</b>	<i>Endoplasmic Reticulum Protein 5</i> , proteína 5 do retículo endoplasmático
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>Fc</b>	Região do Fragmento cristalizável
<b>FcγRIIIA</b>	Receptor IIIa para a porção Fc da imunoglobulina G, IgG
<b>FMO</b>	<i>Fluorescence Minus One</i> , fluorescência menos um
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead box P3</i> , fator de transcrição nuclear P3
<b>FP</b>	Fluido Peritoneal
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i> , dispersão frontal de luz
<b>FSH</b>	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i> , hormônio folículo estimulante

<b>GP1R</b>	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i> , receptor 1 de estrogênio acoplado à proteína G
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>GREB1</b>	<i>Growth Regulating Estrogen Receptor Binding 1</i> , fator de ligação 1 do receptor de estrogênio regulador do crescimento
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> , hormônio liberador de gonadotrofina
<b>HCFMUSP</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , antígeno leucocitário humano
<b>IFN-γ</b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>KIR</b>	<i>Killer Immunoglobulin like Receptor</i>
<b>LAMP1</b>	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> , ou CD107a
<b>LAQ</b>	Mulheres controles provenientes de laparoscopia para laqueadura tubária
<b>M</b>	Molar
<b>MASP1</b>	<i>Mannose-Associated Serine Protease 1</i> , serina-protease 1 associada à manose.
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> , proteína quimiotática de monócitos-1
<b>med</b>	Mediana
<b>MFI</b>	<i>Median Fluorescence Intensity</i> , mediana de intensidade de fluorescência
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade
<b>MICA</b>	<i>Major Histocompatibility Class I Chain-related A</i>
<b>MIF</b>	<i>Macrophage migration Inhibitory Factor</i> , fator inibidor da migração de macrófago
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Mililitro(s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP</b>	<i>Matrix Metalloproteinase Protein</i> , proteína metaloproteinase de matriz
<b>mRNA</b>	<i>messenger Ribonucleic Acid</i> , ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i> , célula matadora natural
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor-kappa B</i> , fator nuclear <i>kappa B</i>
<b>NKG2D</b>	<i>Natural Killer- group 2, member D</i> , membro D do grupo 2 de receptores de células natural killer
<b>NKreg</b>	Célula <i>Natural Killer</i> reguladora
<b>ns</b>	não significativa
<b>ON</b>	<i>Over-nigth</i> , por uma noite
<b>OVA</b>	Endometriose Ovariana
<b>PASS</b>	programa estatístico <i>Power Analysis Sample Size</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> , células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampão fosfato-salino

<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
<b>pg</b>	Picograma (s)
<b>PROF (Prof.)</b>	Endometriose Profunda
<b>PROL</b>	Fase Proliferativa do ciclo menstrual
<b>qRT-PCR</b>	<i>quantitative Real Time PCR</i> , PCR quantitativo em tempo real
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i> , regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
<b>rASRM</b>	<i>Revised American Society for Reproductive Medicine</i> , 1996
<b>RC</b>	Retrocervical
<b>RE</b>	Receptor de Estrogênio
<b>RIN</b>	<i>RNA Integrity Number</i> , pontuação de integridade para o RNA
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> , ácido ribonucleico
<b>ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona
<b>RS</b>	Retossigmóide
<b>R10</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , RPMI, meio de cultura celular adicionado de 10% de soro fetal bovino
<b>SECRET</b>	Fase Secretora do ciclo menstrual
<b>sMICA</b>	MICA solúvel
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i> , dispersão lateral de luz
<b>SUP</b>	Endometriose Superficial
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> , fator de transformação do crescimento beta
<b>Th</b>	<i>T helper cell</i> , linfócito T auxiliar
<b>TNF-α</b>	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa
<b>TRAIL</b>	<i>TNF- Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> , ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
<b>uNK</b>	Células NK uterinas
<b>VEGF-A</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> , fator de crescimento vascular endotelial A
<b>VEGFR-2</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> , receptor 2 do fator de crescimento vascular endotelial
<b>vs</b>	abreviatura de <i>versus</i> , do latim, em comparação com
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>%</b>	porcentagem

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática das principais funções das células NK, no contexto de células saudáveis e tumorais/estressadas.....	22
<b>Figura 2</b>	Principais receptores inibidores e ativadores nas células NK, e seus ligantes em célula alvo.....	23
<b>Figura 3</b>	Ativação de vias relacionadas ao receptor NKG2D.....	25
<b>Figura 4</b>	Mecanismos básicos de ação das células NK.....	26
<b>Figura 5</b>	Papel duplo de MICA como molécula alvo para imunovigilância por células NK e como mediadora do escape imunológico de tumor/células stressadas.....	30
<b>Figura 6</b>	Desenho do estudo.....	41
<b>Figura 7</b>	Esquema resumido do protocolo para avaliação da atividade efetora de células NK, baseado na degranulação da molécula CD107a, expressão das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 e na sua atividade citotóxica.....	50
<b>Figura 8</b>	Estratégia de análise para determinação das subpopulações de células NK circulantes e subpopulações NK com expressão de NKG2D, de mulheres com endometriose e controles.....	54
<b>Figura 9</b>	Estratégia de análise para expressão de MICA em células K562.....	57
<b>Figura 10</b>	Estratégia de análise para determinação das subpopulações de células NK circulantes, com expressão de CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10, em mulheres com endometriose e controles.....	60
<b>Figura 11</b>	Estratégia de análise para determinação da atividade citotóxica de células NK contra células K562.....	63
<b>Figura 12</b>	Expressão de mRNA de MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles.....	67
<b>Figura 13</b>	Expressão do gene MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual.....	68
<b>Figura 14</b>	Escore de imunorreatividade para expressão proteica de MICA em glândula (epitélio) e estroma, e representação da expressão em endométrio eutópico.....	69
<b>Figure 15</b>	Exemplos representativos de expressão da proteína MICA, por imunohistoquímica, em lesão de retossigmóide e em endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles.....	71
<b>Figura 16</b>	Comparação dos escores de imunorreatividade (EIR) de expressão de MICA na lesão profunda, endométrio eutópico de mulheres dos grupos endometriose e controle.....	72
<b>Figura 17</b>	Porcentagem de casos positivos com baixa ou alta expressão proteica de MICA no epitélio glandular, de acordo com os escores de imunorreatividade (EIR).....	73

<b>Figura 18</b>	Escores de imunorreatividade de expressão proteica de MICA no epitélio glandular e estroma na lesão profunda e endométrio eutópico de mulheres do grupo endometriose e no endométrio eutópico de mulheres do grupo controle, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual.....	74
<b>Figura 19</b>	Comparação da expressão de MICA entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na lesão de endometriose profunda e nos endométrios eutópicos de mulheres com endometriose e de controles.....	75
<b>Figura 20</b>	Escore de imunorreatividade para a expressão da proteína MICA na lesão profunda e no endométrio eutópico de mulheres com EDT em estádios iniciais e avançados da endometriose, e no endométrio eutópico do grupo CTR.....	76
<b>Figura 21</b>	Escore de imunorreatividade para a expressão da proteína MICA em lesões profundas de endometriose retossigmóide e retrocervical.....	77
<b>Figura 22</b>	Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL) no soro e fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose (EDT) e controles (CTR).....	78
<b>Figura 23</b>	Análise de correlação entre os níveis de sMICA no soro e no fluido peritoneal (FP), em mulheres com endometriose (EDT) e controles (CTR).....	79
<b>Figura 24</b>	Distribuição dos níveis de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles.....	79
<b>Figura 25</b>	Comparação dos níveis MICA solúvel entre mulheres em estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da endometriose e controles, no soro e no fluido peritoneal.....	80
<b>Figura 26</b>	Níveis de MICA solúvel, no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose em diferentes estádios da endometriose e em controles.....	81
<b>Figura 27</b>	Distribuição dos níveis de MICA solúvel, no soro e fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose e de controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual.....	82
<b>Figura 28</b>	Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL), no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose e de controles saudáveis, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual.....	82
<b>Figura 29</b>	Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL) no soro e no FP de mulheres com endometriose de acordo com o local de acometimento da doença, e no grupo controle.....	84
<b>Figura 30</b>	Análises de correlação entre os valores de $1/\Delta Ct$ para mRNA de MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e os níveis de MICA solúvel.....	85
<b>Figura 31</b>	Análise de correlação entre os níveis de sMICA, no soro e no fluido peritoneal, e a expressão proteica <i>in situ</i> de MICA em epitélio glandular.....	86
<b>Figura 32</b>	Porcentagem das subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, na condição <i>ex vivo</i> .....	89
<b>Figura 33</b>	Comparação entre a frequência de células NK totais (A) e das subpopulações CD56 <sup>dim</sup> (B) e CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup> (C) entre estádios iniciais	

	(I/II) da endometriose e controles.....	90
<b>Figura 34</b>	Porcentagem (%) de células com expressão de NKG2D nas subpopulações NK circulantes em mulheres com endometriose e controles saudáveis, na condição <i>ex vivo</i> .....	92
<b>Figura 35</b>	Análise da frequência de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, entre as subpopulações de células NK, nos grupos EDT e CTRs, no estado basal de cultura (sem estímulo) .....	99
<b>Figura 36</b>	Comparação da frequência de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição basal, sem estímulo.....	101
<b>Figura 37</b>	Análise de correlação entre a porcentagem de células com expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, na subpopulação CD56 <sup>dim</sup> circulante, de mulheres com endometriose, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	104
<b>Figura 38</b>	Alterações significativas ocorridas após o estímulo com K562 (Est. K562), em relação à condição sem estímulo, em mulheres com endometriose e controles.....	108
<b>Figura 39</b>	Comparação da intensidade de expressão de moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK na subpopulação CD56 <sup>bright</sup> circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição após estímulo com células K562.....	109
<b>Figura 40</b>	Análise de correlação entre as frequências de células positivas, e entre as intensidades de expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, em subpopulações de células NK circulantes, de mulheres do grupo controle, na condição após estímulo com K562.....	111
<b>Figura 41</b>	Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas e expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel de mulheres com endometriose e controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	121
<b>Figura 42</b>	Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas para a expressão de IFN- $\gamma$ em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles, na condição com estímulo com células K562.....	123
<b>Figura 43</b>	Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas para a expressão CD107a em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel de mulheres com endometriose e de controles, na condição após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	125
<b>Figura 44</b>	Comparação da porcentagem (%) de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	129
<b>Figura 45</b>	Comparação da porcentagem de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição com estímulo com células K562.....	132

<b>Figura 46</b>	Comparação da porcentagem (%) de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição após estímulo com células K562 bloqueadas para molécula MICA.....	136
<b>Figura 47</b>	Frequência de expressão (%) de IFN- $\gamma$ em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	142
<b>Figura 48</b>	Frequência da porcentagem (%) de expressão das moléculas IFN- $\gamma$ e IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, de mulheres com endometriose e de controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562.....	143
<b>Figura 49</b>	Comparação da intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição com estímulo com células K562.....	144
<b>Figura 50</b>	Porcentagem (%) de células com expressão de CD107a e IL-10 e intensidade de expressão de IL-10, em subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose e em controles, em diferentes fases do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	145
<b>Figura 51</b>	Intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, em diferentes fases do ciclo menstrual, na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	147
<b>Figura 52</b>	Comparações da citotoxicidade (CTX) pelas células NK circulantes entre mulheres com endometriose e controles.....	150
<b>Figura 53.</b>	Citotoxicidade pelas células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA.....	151
<b>Figura 54.</b>	Citotoxicidade pelas células NK circulantes frente a células K562 e células K562 bloqueadas para MICA, nos diferentes estádios da endometriose.....	151
<b>Figura 55.</b>	Citotoxicidade pelas células NK circulantes de mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e de controles.....	152
<b>Figura 56.</b>	Porcentagem (%) de morte de células K562 e células K562 após o bloqueio da proteína MICA, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, em mulheres com endometriose e controles.....	154
<b>Figura 57.</b>	Comparações da frequência de morte de células K562 com e sem bloqueio da proteína MICA, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, entre os grupos de mulheres com endometriose e controles.....	155
<b>Figura 58.</b>	Comparações da frequência de morte de células K562, e de células K562BLOQ, entre as diferentes fases do ciclo, no grupo de mulheres com endometriose e controles.....	156

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características clínicas e demográficas das mulheres com endometriose e controles.....	66
<b>Tabela 2</b>	Escore de imunorreatividade para epitélio glandular e estroma da expressão da proteína MICA, na lesão profunda de endometriose e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e controles.....	70
<b>Tabela 3</b>	Níveis de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles.....	78
<b>Tabela 4</b>	Distribuição das lesões de endometriose segundo os tipos e estádios da endometriose.....	83
<b>Tabela 5</b>	Medianas das frequências de subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, na condição <i>ex vivo</i> .....	90
<b>Tabela 6</b>	Comparação da frequência de células com expressão do receptor NKG2D, e intensidade de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição <i>ex vivo</i> .....	93
<b>Tabela 7</b>	Análise de correlação da frequência, e da intensidade de expressão, de NKG2D nas subpopulações de células NK, com os níveis de MICA solúvel, no grupo de mulheres com endometriose e controles.....	94
<b>Tabela 8</b>	Porcentagem de células com expressão de IFN- $\gamma$ ou IL-10, e intensidades de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles saudáveis, na condição <i>ex vivo</i> .....	95
<b>Tabela 9</b>	Análise da intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, nas subpopulações de células NK, entre grupos EDT e CTRs, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	100
<b>Tabela 10</b>	Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose e controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	103
<b>Tabela 11</b>	Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose (A) e controles (B), entre as condições sem estímulo e após estímulo com células K562.....	106
<b>Tabela 12</b>	Comparação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição após estímulo com células K562.....	110
<b>Tabela 13</b>	Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose (A) e controles (B), na condição após estímulo com células K562.....	112

<b>Tabela 14</b>	Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose (A) e controles (B), entre as condições após estímulo K562, e após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	114
<b>Tabela 15</b>	Comparação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 e entre as suas intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição de estímulo com K562 bloqueadas para a proteína MICA.....	117
<b>Tabela 16</b>	Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 e entre suas intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose (A) e controles (B), na condição após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	119
<b>Tabela 17</b>	Balanço dos principais resultados da correlação entre a expressão de moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e níveis de MICA solúvel.....	126
<b>Tabela 18</b>	Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e entre controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.....	130
<b>Tabela 19</b>	Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição estímulo com células K562.....	133
<b>Tabela 20</b>	Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.....	137
<b>Tabela 21</b>	Balanço dos principais resultados da expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e sua relação com estádios de endometriose.....	138
<b>Tabela 22</b>	Balanço das principais diferenças das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, e suas intensidades de expressão, entre os grupos endometriose e controles, e relação com a fase do ciclo menstrual.....	148
<b>Tabela 23</b>	Análise de correlação entre a citotoxicidade contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA, com a frequência ou intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, em mulheres do grupo controle.....	158
<b>Tabela 24</b>	Análise de correlação entre a citotoxicidade contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA, com a frequência ou intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10, em mulheres com endometriose.....	159

## RESUMO

Marin MLAC. *Papel de MICA na endometriose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A endometriose (EDT) é uma doença caracterizada pela presença de epitélio semelhante ao endométrio e/ou estroma, fora do endométrio e miométrio, com alterações imunológicas que incluem a redução da atividade citotóxica de células NK e TCD8+. MICA (*Major Histocompatibility Complex class I Chain-related A*) é uma molécula, principalmente, induzida por estresse biológico, e sua forma solúvel (sMICA) modula, negativamente, a expressão do seu receptor NKG2D, em células NK e TCD8+ $\alpha\beta$ T, reduzindo a resposta citotóxica. Investigamos o papel de MICA na fisiopatologia da EDT, analisando diversos parâmetros biológicos, e considerando seus estádios e sítios de acometimento, assim como a potencial participação de MICA solúvel (sMICA) na deficiência da atividade efetora de células NK. A expressão gênica de MICA (qRT-PCR) no endométrio eutópico (EDT, n=29; CTR, n= 23) não mostrou diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, a sua expressão proteica (imunohistoquímica) mostrou maior frequência de “alta” expressão no epitélio glandular do endométrio eutópico na EDT, em relação ao CTR ( $p= 0,0134$ ), sugerindo haver alterações imunológicas em células endometriais, envolvendo MICA, previamente à sua migração e instalação ectópica, sugerindo, assim, seu papel na resposta inflamatória e como fonte de sMICA. Os níveis de sMICA (ELISA) foram maiores no grupo EDT (n=161; soro,  $p= 0,0004$ ; FP,  $p < 0,0001$ ), tanto nos estádios iniciais (soro,  $p= 0,0114$ ; FP,  $p= 0,0052$ ) como nos avançados da doença (soro,  $p= 0,0001$ ; FP,  $p < 0,0001$ ), em relação aos CTRs (n=76), também associados à doença profunda (PROF) (soro,  $p= 0,003$ ; FP,  $p= 0,0004$ ) e PROF + ovariana (OVA) (soro,  $p < 0,0001$ ; FP,  $p < 0,0001$ ), em relação aos CTRs. Esses resultados sugerem o envolvimento de sMICA na fisiopatologia da endometriose, na sua progressão e/ou gravidade. A menor frequência da subpopulação citotóxica CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p= 0,0456$ ) (citometria de fluxo), na EDT, pode contribuir para a deficiência de citotoxicidade observada na doença. Por outro lado, a maior intensidade de expressão do receptor ativador, NKG2D, em NK ( $p= 0,0402$ ) (citometria de fluxo), na EDT, e particularmente, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p= 0,033$ ) nos estádios iniciais, indica maior potencial de ativação das células NK na EDT, e nos estádios iniciais da doença. Observamos deficiência de citotoxicidade pelas células NK, na EDT ( $p= 0,0144$ ) (cocultura e citometria de fluxo), principalmente em estádios avançados ( $p= 0,0115$ ), em concordância com a literatura. A citotoxicidade pelas células NK, na presença de estímulo com células alvo bloqueadas para MICA (mimetizando o efeito de sMICA), foi menor apenas em estádios iniciais, na comparação ao estímulo sem bloqueio ( $p= 0,0313$ ), e menor também em relação ao grupo CTR ( $p= 0,0181$ ). Esses dados, juntamente com a correlação negativa entre os níveis de sMICA e a expressão de NKG2D nas células NK (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>,  $r= -0,6$ ,  $p= 0,0167$ ), sugerem que os altos níveis de sMICA podem inibir a expressão de NKG2D e, conseqüentemente, a função efetora das células NK, principalmente nos estádios iniciais da doença, quando detectamos maior expressão de NKG2D nas células NK. A maior expressão de IFN- $\gamma$  na EDT (cocultura e citometria de fluxo), na condição basal, sem estímulo, é concordante com a condição inflamatória da doença, em curso. No entanto, na condição de estímulo, houve menor expressão de CD107a (CD56<sup>dim</sup>,  $p= 0,0308$ ), IFN- $\gamma$  (CD56<sup>bright</sup>,  $p= 0,001$ ) e IL-10 (CD56<sup>bright</sup>,  $p= 0,0222$ ) (cocultura e citometria de fluxo), na EDT, indicando deficiência nas respostas efetora e imunorreguladora de células NK, quando desafiadas. O bloqueio para MICA, *in vitro*, não alterou a expressão dessas moléculas, nas células NK, em nenhum dos grupos, sugerindo que sMICA não afeta, de forma robusta, a expressão dessas

moléculas (cocultura e citometria de fluxo), ao menos no contexto *in vitro*. No entanto, a correlação negativa entre os níveis de sMICA e a expressão de CD107a (CD56<sup>bright</sup>,  $r = -0,7$ ,  $p = 0,0057$ ), observada apenas na EDT, sugere que, *in vivo*, sMICA tenha um efeito negativo na via de degranulação, possivelmente, em combinação com outros distúrbios imunológicos na doença. Em conjunto, os nossos resultados apoiam o envolvimento MICA na fisiopatologia da EDT, e de sMICA contribuindo para a deficiência da atividade citotóxica das células NK. MICA pode exercer papéis tanto pró-inflamatório como imunorregulador, contribuindo para geração/manutenção de um contexto biológico misto, de inflamação descontrolada e imunossupressão, prejudicando a eliminação adequada de tecidos endometriais ectópicos e no reestabelecimento da homeostase.

**Descritores:** Endometriose; MICA; NKG2D; Células NK; Citotoxicidade NK; CD107a; Interferon-gama; IL-10.

## ABSTRACT

Marin MLAC. *Role of MICA in Endometriosis* [thesis]. São Paulo: “Faculty of Medicine, University of São Paulo”; 2022

Endometriosis (EDT) is a disease characterized by the presence of endometrium-like epithelium and/or stroma outside the endometrium and myometrium, usually with an associated inflammatory process, presenting immunological alterations including Natural Killer (NK) and TCD8+ cell deficient cytotoxic activity. MICA (MHC, Major Histocompatibility Complex class I Chain-related A) molecule is mainly induced by biological stress, and its soluble form (sMICA) negatively modulates the expression of NKG2D receptor, on NK e TCD8+ $\alpha\beta$ T cells, reducing their cytotoxic activity. We investigated the role of MICA in the pathophysiology of EDT, analyzing several biological parameters, and considering disease stages and sites of involvement, as well as the potential participation of sMICA in the deficiency of NK cells effector activity. MICA gene expression (qRT-PCR) in eutopic endometrium (EDT, n=29; CTR, n=23) showed no difference between groups ( $p > 0.05$ ). However, MICA protein expression (immunohistochemistry) showed a higher frequency of “high” expression in eutopic endometrial glandular epithelium in EDT, in relation to CTRs ( $p = 0.0134$ ), suggesting immunological alterations in endometrial cells, involving MICA, before their ectopic migration and installation. This suggests that MICA’s upregulation has role in the inflammatory response, as well as a source of sMICA. Soluble MICA levels (ELISA) were higher in EDT (n=161; serum,  $p = 0.0004$ ; FP,  $p < 0.0001$ ), both in the initial (serum,  $p = 0.0114$ ; FP,  $p = 0.0052$ ) and advanced stages of the disease (serum,  $p = 0.0001$ ; FP,  $p < 0.0001$ ), in relation to CTRs (n=76), and also associated with deep (DE) (serum,  $p = 0.003$ ; FP,  $p = 0.0004$ ) and DE + ovarian disease (OMA), (serum,  $p < 0.0001$ ; FP,  $p < 0.0001$ ), in relation to CTRs. These results point out sMICA’s involvement in endometriosis pathophysiology, disease severity and progression. The lower frequency of the CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> cytotoxic subpopulation ( $p = 0.0456$ ) (flow cytometry), in EDT, may contribute to the cytotoxicity deficiency observed in the disease. On other hand, the higher expression of the activator receptor, NKG2D, on NK cells in EDT ( $p = 0.0402$ ) (flow cytometry) and particularly in the early stages of EDT for the CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> subset ( $p = 0.033$ ), indicates a greater potential for NK cell activation in EDT, and in the early stage of the disease. We also observed NK cell cytotoxicity deficiency in EDT ( $p = 0.0144$ ) (coculture and flow cytometry), mainly in the advanced stages ( $p = 0.0115$ ), in agreement with the literature. NK cell cytotoxicity, induced by stimulus with target cells blocked for MICA (mimicking the effect of soluble MICA), was lower only in early stages ( $p = 0.0313$ ), and also lower in relation to the CTR group ( $p = 0.0181$ ). These data, together with the negative correlation between sMICA levels and NKG2D expression on NK cells (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>,  $r = -0.6$ ,  $p = 0.0167$ ), suggest that high levels of sMICA may inhibit the expression of NKG2D and, consequently, NK cells’ effector function, especially in the early stages of the disease, when greater expression of NKG2D in NK cells is detected. The higher expression of IFN- $\gamma$  in the basal condition in EDT (coculture and flow cytometry), is consistent with the ongoing inflammatory process of the disease. However, when stimulated *in vitro* NK cells in EDT showed lower expression of CD107a (CD56<sup>dim</sup>,  $p = 0.0308$ ), IFN- $\gamma$  (CD56<sup>bright</sup>,  $p = 0.001$ ) and IL-10 (CD56<sup>bright</sup>,  $p = 0.0222$ ) (coculture and flow cytometry), indicating NK cell functional deficiency in both effector and immunoregulatory responses, upon challenge. Blocking MICA, *in vitro*, did not alter the expression of these molecules (coculture

and flow cytometry), in NK cells in any of the groups, suggesting that sMICA has no robust effect on the expression of these molecules, at least *in vitro*. Nevertheless, the negative correlation between sMICA levels and CD107a expression (CD56<sup>bright</sup>,  $r = -0.7$ ,  $p = 0.0057$ ), observed only in EDT, suggests that, *in vivo*, sMICA may have a negative effect on the degranulation pathway, possibly in synergy with other immunological dysfunctions in the disease. Taken together, our results support the involvement of MICA in the pathophysiology of EDT, and that sMICA contributes to the impairment of NK cell cytotoxic activity. MICA can play both, pro-inflammatory and immunoregulatory roles, contributing to the generation/maintenance of a mixed biological setting, of uncontrolled inflammation and immunosuppression, impairing the adequate elimination of ectopic endometrial tissues and reestablishment of homeostasis.

**Keywords:** Endometriosis; MICA; soluble MICA; NKG2D; NK cells; NK cytotoxicity; CD107a, Interferon-gamma; IL-10.

---

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Endometriose

#### 1.1.1 Definição e classificação

A endometriose (EDT) é uma doença inflamatória caracterizada pela presença de epitélio, e/ou estroma, similar ao endométrio, fora do endométrio e miométrio (Tomassetti et al. 2021) sendo, frequentemente, acompanhada de fibrose e aderências (Zondervan et al., 2018).

A prevalência exata da doença não é bem estabelecida, no entanto, estima-se que afete de 10 a 15% das mulheres em idade fértil (Giudice, 2010) Tem como sintomas característicos: dor pélvica grave (durante e após o ato sexual - dispareunia de profundidade; dismenorreia, e/ou dor acíclica), alterações intestinais (tenesmo, disquezia e hematoquezia) e urinárias cíclicas (disúria e hematúria), além de associação com infertilidade (Berkley et al., 2005). Assim sendo, a EDT pode, de forma significativa, impactar a saúde e a qualidade de vida de mulheres afetadas pela doença (Giudice e Kao 2004).

O diagnóstico da doença é realizado, inicialmente, por meio da sintomatologia e história clínica da paciente, em associação ao exame físico ginecológico (Borreli, 2015a). Exames de imagem, como ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal, ressonância nuclear magnética, ecoendoscopia e ultrassom transretal são considerados exames de auxílio ao diagnóstico (Abrao et al., 2007). No entanto, o diagnóstico definitivo é obtido por meio de exame histológico da lesão suspeita (Abrão et al., 2000) obtida, na sua maior parte, por meio de cirurgia laparoscópica (Borreli 2015a).

A EDT já teve várias formas de classificação baseadas em diferentes abordagens e critérios (Chapron et al., 2003; Hassa et al., 2009). Muito recentemente, foi definida uma nova classificação para a EDT, pela Associação Americana de Laparoscopistas Ginecológicos (AAGL) (Abrao et al. 2021), com o objetivo de melhor pontuar os níveis de complexidade cirúrgica intra-operatória e examinar sua associação com a dor relatada pela paciente e a ocorrência de infertilidade.

No nosso estudo, foi utilizada a classificação proposta pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva e revisada em 1996 (*Revised American Society for Reproductive Medicine*, rASRM, 1996) (Canis et al. 1997) que, até então, vinha sendo a classificação mais amplamente utilizada. Trata-se de uma classificação cirúrgica que utiliza como base a extensão da doença durante o procedimento cirúrgico, baseando-se no tamanho da lesão, localização dos implantes de tecido endometrial e extensão das adesões. Segundo um sistema de pontuação, ela divide a EDT em diferentes estádios: I (1-5 pontos), II (6-15 pontos), III (16-40 pontos) e IV (> 40 pontos) (Apresentado no Item 7, Anexos; Anexos III e

IV). Segundo tal classificação, o estágio I é considerado como EDT mínima, estágio II, leve, estágio III, moderada e estágio IV, como EDT grave. Desta forma, em relação à gravidade da doença, podemos considerar I e II como os estágios mais leves, e os estágios III e IV, como os mais graves da doença.

É importante salientar que, embora a classificação rASRM seja amplamente utilizada e aceita mundialmente, é consenso entre especialistas que ela apresenta limitações (Andres et al. 2018). Tal sistema de classificação não leva em consideração a presença da doença profunda em diferentes locais, como ligamentos uterossacros, bexiga, vagina e o intestino, bem como não descreve, adequadamente, os locais de acometimento da doença (Andres et al. 2018), tendo sido, portanto, como acima citado, recentemente atualizada (Abrao et al., 2021).

Além da classificação cirúrgica da EDT, há também uma classificação segundo a localização e profundidade das lesões. São definidos 3 fenótipos: EDT: superficial (SUP), EDT ovariana (OVA; endometrioma) e EDT do septo retovaginal, esta, mais recentemente caracterizada como EDT profunda (PROF) (Kamergorodsky et al., 2009). A doença superficial é caracterizada por lesões peritoneais, geralmente no peritônio pélvico; a ovariana pode apresentar-se com implantes superficiais no ovário ou cistos com conteúdo achocolatado, derivado de repetidas hemorragias do foco endometriótico no cisto, durante a menstruação. A doença PROF representa 20% dos casos de endometriose (Chapron et al., 1999) e é considerada a forma mais agressiva da doença (Abrão et al., 2015), com sintomas mais graves quando comparada à EDT superficial, incluindo dismenorreia grave e infertilidade (Abrão et al., 2015). Caracteriza-se por lesões com infiltração com profundidade igual ou superior a 5mm em estruturas anatômicas ou órgãos como, por exemplo, ligamentos uterossacros, ureteres, bexiga, região retrocervical, retossigmóide, íleo terminal e apêndice cecal (Cornillie et al., 1990). Porém, dentre os diferentes locais e apresentações da doença PROF, o acometimento retovaginal e retossigmóide é considerado dos mais incapacitantes (Borreli 2015), sendo associado à perda da qualidade de vida de mulheres acometidas (Dubernard et al., 2006). É importante salientar que, apesar de descritos 3 fenótipos clínicos para a endometriose, em muitos casos, eles podem coexistir em uma mesma paciente, sendo considerada uma doença multifocal (Eres et al., 2018).

Além das classificações já apresentadas, a EDT é também classificada, histologicamente, em dois tipos: EDT estromal (presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio eutópico em qualquer fase do ciclo menstrual) e EDT glandular (presença de epitélio com sinais de hemorragia prévia com hemossiderófagos e fibrose) (Abrao et al., 2003). É importante salientar que recentes avanços na caracterização da doença têm sugerido uma modificação na atual definição histológica (ainda não estabelecida), incluindo a fibrose como um componente da lesão endometrial, de forma a reconsiderar a definição histológica, previamente definida, como “uma condição fibrótica na qual o estroma e o epitélio endometrial podem ser identificados” (Vigano et al., 2018).

### 1.1.2 Patogênese, fisiopatologia e progressão da endometriose

Desde os primeiros achados de tecido de implantes do endométrio em ovário (Russel, 1899), diversas hipóteses têm sido propostas para a patogênese e progressão da EDT. Tais hipóteses não são excludentes e podem contribuir de forma complementar, para a compreensão da patogênese e da fisiopatologia da endometriose.

A hipótese mais aceita para a origem de células endometriais em localização ectópica é, possivelmente, a frequente ocorrência da menstruação retrógrada (Sampson 1927b). Na menstruação retrógrada, o tecido endometrial reflui pelas tubas de Falópio até a cavidade peritoneal, facilitando a sua implantação e desenvolvimento no peritônio e/ou órgãos pélvicos. A detecção de detritos menstruais na cavidade peritoneal durante a menstruação, em condição fisiológica, é uma evidência de que tecido endometrial acessa, fisiologicamente, sítios fora do útero (Liu e Hitchcock, 1986). Além disso, dados epidemiológicos mostram haver um risco aumentado da doença quando há maior "exposição" à menstruação, seja por aumento do sangramento menstrual, ciclo mais curto, duração e maior número de menstruações (Missmer *et al.*, 2004), obstrução do fluxo uterino (Barbieri 1998) e anormalidades fisiológicas na contratilidade uterina (Salamanca e Beltran, 1995), indicando serem relevantes também, a quantidade e o tempo de exposição de restos menstruais que podem acessar sítios anatômicos fora do útero.

Assim sendo, além da menstruação retrógrada, existem dados que apontam a possibilidade de outros mecanismos envolvidos na origem das células endometriais ectópicas, como as seguintes condições e hipóteses: 1) *metaplasia celômica*: células mesoteliais do peritônio se diferenciariam em tecido endometrial, possivelmente, influenciadas por estímulos hormonais, infecciosos ou ambientais; 2) *ativação de restos embriogênicos*: uma diferenciação aberrante ou migração de dutos Müllarianos poderia levar ao "espalhamento" de células durante a organogênese; 3) *disseminação metastática (hematogênica ou linfática)*: células endometriais viáveis sairiam do endométrio pela circulação sanguínea ou linfática, de maneira similar à metástase tumoral, favorecendo a ocorrência de endometriose longe do útero, onde se implantariam formando lesões endometrióticas (Sampson, 1927a). A disseminação linfática poderia, pelo menos em parte, explicar a presença de tecido endometrial em vasos linfáticos e linfonodos (Aoki, 1967; Borrelli *et al.*, 2015), bem como as raras ocorrências de endometriose em pulmões (Hobbs e Bortnick, 1940) e fígado (Liu *et al.*, 2015); 4) *células tronco*: células tronco extrauterinas/progenitoras originadas da medula óssea (como linhagens mesenquimais) poderiam se diferenciar, ectopicamente, em tecido endometrial. No entanto, essas outras possibilidades de origens da ocorrência de tecido endometrial fora do útero, parecem ser menos frequentes.

Embora a menstruação retrógrada explique o deslocamento físico do tecido endometrial para fora do útero, deve-se considerar que esse é um processo fisiológico muito comum, ocorrendo em até 90% das mulheres que menstruam. No entanto, uma vez que a prevalência de endometriose varia em torno de 10%, este fator, isoladamente, não explica a ocorrência de EDT, e outros fatores devem contribuir facilitando o implante e desenvolvimento do tecido endometrial (lesões) fora do útero (Burney e Giudice, 2012).

Após a ocorrência ectópica de células endometriais, vários fatores podem contribuir para a formação das lesões endometrióticas. Dentre eles, podemos citar a fixação e penetração na superfície peritoneal (na menstruação retrógrada como origem), proliferação celular, invasão, angiogênese, neurogênese e inflamação, fatores esses, possivelmente, envolvidos no desencadeamento da dor (Zondervan *et al.*, 2018). Variações gênicas, como polimorfismos nos genes WNT4 (do inglês, *Wnt Family Member 4*) e GREB1 (do inglês, *Growth Regulating Estrogen Receptor Binding 1*) (revisado em Borghese *et al.*, 2017) bem como variações epigenéticas, como metilação anormal em fatores de transição (GATA6 e SF1 -do inglês, *Steroidogenic Factor 1*) e no gene ERB2 (do inglês, *Encoding Estrogen Receptor 2*, que codifica o receptor ER $\beta$ , do inglês, *Estrogen Receptor Beta*), também parecem contribuir para a etiologia da doença (revisado em Borghese *et al.*, 2017). Destacamos que a hipometilação no gene ERB2, na EDT, gera uma falha na repressão da expressão do receptor ER $\beta$ , que passa a ser superexpresso no endométrio ectópico, em relação ao eutópico, de mulheres com EDT (Monsivais *et al.*, 2014). Ademais, alterações metabólicas, como o aumento do metabolismo de vitamina A, e consequente diminuição, parece ser relevante para a etiologia da endometriose. O ácido retinóico (AR), metabólito fisiológico ativo da vitamina A (retinol), controla diversos processos biológicos, como diferenciação, apoptose e sobrevivência celular, via sinalização por receptores nucleares em células alvo (RARs, do inglês, *retinoic acid receptor*) (revisado em Jiang *et al.*, 2018). Sua via de ativação está envolvida na proliferação de epitélios e a transformação de células estromais endometriais em células decíduais especializadas. Portanto, a sinalização deficiente em ácido retinóico pode implicar em aumento da proliferação e invasão celular, bem como limitar a apoptose celular de células endometriais ectópicas. Além disso, estrogênio (via receptor  $\beta$ ), descrito como aumentado em tecido endometrial ectópico (Bulun, 2009), também pode suprimir a catalisação da conversão de retinaldeído em AR, via supressão da enzima ALDH1A1 (do inglês, *Aldehyde Dehydrogenases*), catalisadora da conversão de retinaldeído em AR (Deng *et al.*, 2003). Ademais, e de maneira relevante, também o microambiente da lesão interage e regula tais fatores biológicos por meio uma variedade de fatores hormonais e celulares (revisado em Zondervan *et al.*, 2018), a serem discutidos adiante.

Considerando que o sistema imune é, fisiologicamente, capaz de detectar e eliminar tecidos em desenvolvimento em locais “anormais”, é relevante explorar o seu papel no contexto da endometriose. Nesse sentido, vários estudos indicam que mulheres com EDT

apresentam diversas disfunções imunológicas, contribuindo de forma relevante para a eliminação ineficiente do endométrio ectópico e favorecendo a sua implantação. Assim, a condição imunológica da mulher com EDT é fundamental no desenvolvimento e na progressão da doença (Giudice e Kao, 2004).

## **1.2 Fisiologia do ciclo menstrual e imunobiologia da endometriose**

Durante cada período menstrual, as células somáticas, presentes na região funcional do endométrio, começam a sofrer apoptose, uma resposta biológica que reduz a chance dessas células sobreviverem e crescerem ectopicamente, dentro da cavidade peritoneal (Herington *et al.*, 2011). Neste contexto, vamos destacar, inicialmente, a fisiologia normal do ciclo menstrual, de forma a facilitar o entendimento da imunobiologia da endometriose.

### **1.2.1 Fisiologia do ciclo menstrual**

Estruturalmente, o endométrio humano é composto pelas camadas basal e funcional, esta, eliminada durante a menstruação e regenerada, na ausência de gravidez (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019). É composto ainda de dois compartimentos teciduais: epitélio e estroma. O epitélio endometrial tem a função de promover a implantação do embrião e também tem papel na defesa contra a infecção (Kelly *et al.*, 2001). O estroma consiste, principalmente, de fibroblastos, alguns macrófagos e células T, mas poucas células B e células NK (Kelly *et al.*, 2001). As glândulas tubulares, revestidas por epitélio, vão desde a superfície endometrial até a base do estroma (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019).

O ciclo menstrual, embora contínuo, inicia-se no primeiro dia de menstruação e termina no último dia, antes da próxima menstruação. Tem duração média de 28 dias, podendo variar de 25 a, aproximadamente, 32 dias (Silberstein e Merriam, 2000). O funcionamento ovariano fisiológico envolve atividades coordenadas do hipotálamo, hipófise e ovários. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, do inglês, *Gonadotropin-Releasing Hormone*); a hipófise, secreta o hormônio luteinizante (LH, do inglês, *Luteinizing Hormone*) e hormônio folículo estimulante (FSH, do inglês, *Follicle-stimulating Hormone*); o ovário, secreta estrogênio e progesterona, inibinas, ativinas, e outros moduladores ovarianos. Complementar a esse processo, o endométrio uterino responde aos hormônios estrogênio e progesterona, com produção de prostaglandinas (Silberstein e Merriam, 2000). A morfologia do endométrio, sua proliferação, diferenciação de seus componentes celulares bem como a presença de células imunes, variam ao longo do ciclo sob a influência, principalmente, de estrogênio e progesterona (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019).

O ciclo menstrual pode ser dividido em duas fases, a fase folicular ou proliferativa, e a fase lútea ou secretora. A fase proliferativa inicia-se no primeiro dia da menstruação e segue até a ovulação, geralmente no 14º dia. Portanto, considerando-se um ciclo médio de 28 dias, compreende de 1-14º dia do ciclo. A fase secretora compreende os 14 dias restantes do ciclo (15-28º dia) (revisado em Reed e Carr, 2000).

Durante o ciclo menstrual, os hormônios esteróides ovarianos, estrogênio e progesterona, regulam a função endometrial e a menstruação (Maybin e Critchley, 2015). O endométrio menstrual apresenta características clássicas de inflamação, como edema de tecido e influxo de células do sistema imune, sendo considerado um processo fisiológico e rigidamente regulado (Critchley *et al.*, 2001). Tanto o ovário como o endométrio apresentam um processo de inflamação fisiológica repetido, durante a ovulação e a menstruação, respectivamente, ao longo da vida reprodutiva da mulher (Rae e Hillier, 2005).

Células como macrófagos, neutrófilos e células NK participam da proteção imunológica da mucosa uterina e estão envolvidas no remodelamento endometrial (Salamonsen *et al.*, 2002), decidualização e implantação embrionária e, na ausência de gravidez, facilitam o processo de menstruação (Salamonsen e Lathbury, 2000). A maior parte das células imunes, no endométrio, são tecido residentes, mas parte pode migrar da circulação periférica (Lee *et al.*, 2015). Elas estão espalhadas por todo estroma e também entre as células epiteliais, na camada funcional.

Na fase proliferativa do ciclo, as células T são a maior parte dos leucócitos, seguidas por células NK e macrófagos (Lee *et al.*, 2015). Na camada basal do endométrio, são formados agregados linfóides compostos por células B e circundadas por células TCD8+ citotóxicas, as quais são também circundadas por macrófagos (Yeaman *et al.*, 2001). Os macrófagos compreendem, aproximadamente, 1-2% das células do endométrio e, em torno de 10% do total de células imunes endometriais, na fase proliferativa do ciclo (Salamonsen *et al.*, 2002). Essa frequência é alterada durante as fases do ciclo, sugerindo haver uma regulação por estrogênio e progesterona (Berbic *et al.*, 2009). As células NK uterinas (uNK) compreendem cerca de 30-40% (Manaster e Mandelboim, 2008) de leucócitos totais, na fase proliferativa do ciclo.

Durante a fase proliferativa, o hormônio FSH estimula o ovário a produzir o estrogênio, no entanto, a reparação e regeneração do tecido endometrial, pós menstruação, é independente desse hormônio (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019). Entretanto, posteriormente, durante toda a fase proliferativa, o estrogênio induz a mitose de todos os constituintes celulares, incluindo epitélio luminal e glandular, fibroblastos estromais e componentes vasculares (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019). O estrogênio estimula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) no endométrio uterino (Cullinan-Bove e Koos, 1993), com consequente aumento da sua vascularização. Células do sistema imune, como células TCD4, TCD8, linfócitos B, células NK, monócitos e DCs (do inglês, *Dendritic Cells*) plasmocitóides,

apresentam receptores de estrogênio e podem ter suas funções moduladas por esse hormônio (Kovats, 2015).

Foi demonstrado que o estrogênio modula a expressão de citocinas e quimiocinas por DCs derivadas de monócitos humanos (revisado em Hafner *et al.*, 2013). Por conseguinte, o estrogênio aumenta a produção de interleucina (IL) -12 por DCs, que atua em células Th1, desencadeando a produção de IFN- $\gamma$  por essas células, caracterizando, portanto, o envolvimento do estrogênio na ativação de respostas imunes adaptativas (revisado em Hafner *et al.*, 2013). Também as células Treg estão aumentadas, no endométrio, na presença de estrogênio, durante a fase proliferativa do ciclo, diminuindo durante a fase secretora (Arruvito *et al.*, 2007), possivelmente via interação do receptor  $\alpha$  de estrogênio (ER $\alpha$ , do inglês, *Estrogen Receptor  $\alpha$* ) e o promotor do fator de transcrição de FOXP3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) (Adurthi *et al.*, 2017). Este aumento de Treg, antes da ovulação, sugere seu envolvimento na preparação adequada do endométrio à implantação de embriões. Atuam inibindo a atividade citotóxica de células do sistema imune, bem como a atividade efetora de outros tipos de células, por meio da secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- $\beta$  (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*) (Arruvito *et al.*, 2007), mantendo um ambiente com característica, provavelmente, de imunotolerância (Sakaguchi *et al.*, 2010).

Após a perda da camada funcional do endométrio, na menstruação, no início da fase proliferativa do ciclo, níveis crescentes de estrogênio participam do reparo e crescimento do endométrio a partir da camada basal (Osteen *et al.*, 2003), bem como do aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (do inglês, *Matrix Metalloproteinase Protein*). Alguns estudos indicam que a ativação da transcrição do gene MMP ocorra, principalmente via ligação do receptor de estrogênio com a proteína ativadora-1 (AP-1, do inglês, *Activator Protein 1*) (Teyssier *et al.*, 2001).

De forma coordenada com o remodelamento endometrial, numerosas MMPs são expressas em áreas de crescimento ativo do endométrio, durante toda a fase proliferativa (Rodgers *et al.*, 1994). MMP-7 é expressa em células epiteliais, enquanto as células do estroma expressam mRNAs para MMP-1, MMP-2 e MMP-11, e baixa expressão para MMP-3 (Rodgers *et al.*, 1994). A proteína MMP-9, mas não mRNA, foi identificada em células epiteliais e em associação com células imunes residentes (Skinner *et al.*, 1999). Também os TIMPs (do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, inibidores teciduais de metaloproteinases) são geralmente co-expressos com MMPs, modulando o controle da reparação tecidual (Osteen *et al.*, 2003).

Em recente trabalho (Crona *et al.*, 2021), a análise do perfil de citocinas no plasma de sangue menstrual de mulheres saudáveis indicou a presença de altas concentrações de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8 (ou CXCL8, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*), na comparação com o perfil de citocinas no sangue periférico, pareado, dessas mulheres. No entanto, os níveis de IL-2, IL-12p70, XCL1/linfotactina e IFN- $\gamma$  foram menores do que os níveis periféricos. Estes dados indicam haver um padrão distinto de citocinas no sangue menstrual em relação do sangue

periférico. Neste mesmo estudo, também observaram que as citocinas analisadas no plasma sanguíneo menstrual não tiveram diferença entre as fases do ciclo menstrual.

Uma vez atingindo altos níveis de estrogênio, ocorre a inibição da secreção de FSH pela hipófise. A diminuição do FSH e o aumento do estrogênio estimulam a hipófise a secretar o hormônio LH, que induz a ovulação (Maybin e Critchley, 2015). Após a ovulação, o corpo lúteo passa a secretar altos níveis de progesterona contribuindo na manutenção da receptividade endometrial, em caso de fertilização. Durante a fase secretora (pós-ovulação, e até a menstruação), a progesterona atua sobre o endométrio previamente estimulado com estrogênio, levando à sua decidualização. A decidualização é caracterizada pela transformação das células endometriais estromais em células deciduais secretoras (Gellersen *et al.*, 2007). Alteração e/ou quebra neste processo de diferenciação do endométrio estão associadas a uma série de distúrbios como endometriose e adeniose, sendo também importante causa de infertilidade e distúrbios menstruais (Brosens, 1998).

As respostas celulares à progesterona são, predominantemente, mediadas pelo receptor de progesterona (RP), um membro da superfamília de fatores de transcrição induzíveis de ligante (Parker, 1993). Na ausência de ligação com progesterona, o RP é mantido num complexo inativo contendo proteínas de choque térmico HSP90 (Pratt 1990) e HSP70 (Estes *et al.*, 1987). O RP tem, pelo menos, duas isoformas, RPA e RPB, presentes durante a fase proliferativa do ciclo, tanto em glândula, como no estroma endometrial, ocorrendo um declínio significativo nas células epiteliais glandulares na fase secretora do ciclo. Por outro lado, os RP persistem no estroma endometrial da camada funcional ao longo da fase secretora, com predomínio da isoforma A (Wang *et al.*, 1998). Assim, as células estromais do endométrio permanecem responsivas à progesterona durante toda a fase secretora.

Em relação a expressão proteica do RP em células do sistema imune, embora a progesterona tenha efeitos funcionais em células como linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, o seu mecanismo de ação (ou seja, proteínas alvo) não está claramente definido, com alguns estudos sugerindo a expressão do receptor (Butts *et al.*, 2007; Szekeres-Bartho *et al.*, 1990), e outros não (Mansour *et al.*, 1994).

Em contraste com a fase proliferativa do ciclo, na fase secretora tardia, as células uNK (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>) estão em maior frequência, compreendendo, aproximadamente 70-80% do total de leucócitos. Os macrófagos atingem cerca de 30% e as células T diminuem para menos de 10% (Flynn *et al.*, 2000) dos leucócitos endometriais.

Células dendríticas imaturas (iDC, CD1a<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>HLADR<sup>low</sup>) estão descritas em número aumentado na camada basal, nas fases secretora e menstrual (Marbaix, 2005). No entanto, em relação às DCs maduras (mDC, CD83<sup>high</sup>/HLA-DR<sup>high</sup>), há um estudo indicando ausência de alteração de frequência ao longo do ciclo (Marbaix 2005) e outro com um aumento na camada basal do endométrio, nas fases secretora e menstrual do ciclo menstrual (King *et al.*, 1996).

O aumento de iDC durante a fase secretora/menstrual sugere um papel dessas células na menstruação (Marbaix, 2005). Nesse sentido, as iDCs produzem MMPs que são importantes neste processo (Marbaix, 2005). Além disso, iDCs também produzem citocinas e quimiocinas, como IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , RANTES (do inglês, *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed e Secreted*) e MCP-1, que poderiam promover a menstruação ou facilitar a nidação do embrião e regular outras populações celulares (Schulke *et al.*, 2008).

Em relação às citocinas na fase secretora do ciclo, embora no estudo em sangue menstrual acima descrito (Crona Guterstam *et al.*, 2021), não tenha sido observada diferença nos seus níveis de expressão, entre as diferentes fases do ciclo menstrual, a análise de expressão gênica em sangue periférico mostrou que a expressão IFN- $\gamma$  está diminuída na fase secretora/lútea, comparada com a fase proliferativa/folicular (Dosiou *et al.*, 2004).

Ao final da fase secretora, e na ausência de gravidez, o corpo lúteo regride, causando um relevante declínio nos níveis de progesterona circulantes (Maybin e Critchley, 2015). Esse contexto fisiológico gera uma resposta inflamatória local no endométrio, envolvendo infiltração de leucócitos, liberação de citocinas, edema e ativação de metaloproteinases de matriz (Jabbour *et al.*, 2006), resultando na perda da camada funcional do endométrio (cerca de dois terços superiores), correspondendo ao período menstrual do ciclo. Várias células do sistema imune participam do processo de fisiológico da menstruação, algumas com importante função na eliminação de restos menstruais (“*clearence* uterino”) (Berbic e Fraser, 2013).

Após a queda da progesterona, há um aumento significativo da população de leucócitos endometriais (Salamonsen e Lathbury, 2000), compreendendo de 6-15% do número total de células no endométrio (Salamonsen e Lathbury, 2000). Já voltando à fase proliferativa, no período menstrual, as células dendríticas (imaturas e maduras) e outras células apresentadoras de antígenos (APCs, o inglês *Antigen-Presenting Cell*) estão envolvidas no processo de “limpeza”, participando da captura e apresentação antígenos endometriais e ativando células T, facilitando a eliminação de restos endometriais (Berbic e Fraser, 2013). Os neutrófilos, principais mediadores da resposta inflamatória, respondem à inflamação local, migrando, rapidamente, para o endométrio “inflamado”, onde podem sobreviver por vários dias, devido à diminuição de sua atividade apoptótica, induzida por mediadores pró-inflamatórios e hipóxia (Ward *et al.*, 1999). Há um aumento do número de macrófagos dando-se início ao processo de apoptose de células endometriais e à fagocitose de restos celulares eliminados durante a menstruação (Berbic *et al.*, 2009).

Embora a queda da progesterona tenha um importante papel no início da menstruação, a sua diminuição também promove o aumento da expressão de MMPs, por células epiteliais estromais e neutrófilos (Salamonsen e Woolley, 1999). Os neutrófilos contêm altos níveis de MMPs e têm a capacidade de ativar MMPs residentes, contribuindo para a ruptura endometrial (Gaide Chevonnay *et al.*, 2012). As MMPs funcionam como

mediadores da “ruptura” do endométrio, uma vez que degradam os componentes da matriz extracelular (Marbaix *et al.*, 1996).

Durante a menstruação, as células presentes na região funcional do endométrio e as que compõem o material de menstruação retrógrada, começam a sofrer apoptose (Herington *et al.*, 2011). Estes restos celulares, presentes na cavidade peritoneal, são, posteriormente, eliminados por células do sistema imune, como macrófagos, células NK (do inglês, *natural killer*) e células T citotóxicas, sem que ocorra um processo inflamatório significativo e duradouro (Dmowski *et al.*, 2001). Alguns estudos mostram a existência de uma atividade citotóxica fisiológica mediada por células NK contra células endometriais autólogas (Oosterlynck *et al.*, 1991; Viganò *et al.*, 1991; Hirata *et al.*, 1994). As células NK agiram como um "sistema de limpeza peritoneal" (*clearance*) envolvido na eliminação eficaz de células endometriais ectópicas, evitando assim, sua implantação e crescimento (revisado em Hafner *et al.*, 2013). A ação dessas células é finamente regulada, negativamente, favorecendo a resposta imune específica contra células refluídas, e não contra o tecido peritoneal normal. Alterações nesses processos biológicos da fisiologia da menstruação podem levar a distúrbios ginecológicos e também integram a fisiopatologia da endometriose.

### 1.2.2. Imunobiologia da endometriose

A endometriose é um processo patogênico que envolve múltiplas desregulações imunológicas, bem como desregulações de interações imuno-endócrinas.

Primeiramente podemos citar que o próprio endométrio eutópico de mulheres com EDT apresenta características diferentes quando comparado ao endométrio de mulheres saudáveis. Tais características englobam diversos aspectos, incluindo disfunções imunológicas, endócrinas e bioquímicas, bem como alterações genéticas que, de forma combinada, desempenham um papel importante na patogênese e fisiopatologia da endometriose (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019).

O endométrio eutópico de mulheres com EDT apresenta um aumento da expressão do gene anti-apoptótico BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*) (Jones *et al.*, 1998), diminuindo a capacidade apoptótica de células endometriais deliberadas durante a menstruação, indicando um aumento da viabilidade dessas células, facilitando sua sobrevivência e implantação ectópica (Dmowski *et al.*, 2001). A apoptose espontânea está diminuída em glândulas endometriais de mulheres com EDT, especialmente durante a fase secretora tardia/menstrual e na fase proliferativa precoce (Dmowski *et al.*, 2001). De fato, as células endometriais de mulheres com EDT apresentam maior capacidade de implantação (Kyama *et al.*, 2008), angiogênese (Donnez *et al.*, 1998) e proliferação (Wingfield *et al.*, 1995; Bourlev *et al.*, 2006), com diversos fatores envolvidos, e discutidos abaixo.

As células endometriais, que possuem menor capacidade apoptótica, chegam na cavidade abdominal (células endometriais ectópicas) e invadem o tecido local. Como na EDT há maior capacidade de implantação (Kyama *et al.*, 2008) e angiogênese (Donnez *et al.*, 1998), o crescimento das células endometriais ectópicas leva à formação das lesões endometrióticas (revisado em Liu e Lang, 2011).

A compreensão de como as células endometriais aderem, ectopicamente, aos ovários, ligamentos e superfícies peritoneais e como, uma vez aderidas, essas células proliferam, adquirem suplemento sanguíneo e resultam em endometriose, continua sendo alvo de constantes pesquisas. Dentre os principais possíveis mecanismos envolvidos no estabelecimento e progressão da doença estão a intensa resposta inflamatória em mulheres geneticamente suscetíveis, a transição epitelial-mesenquimal, disfunção imunológica e da presença de um ambiente metabólico e endócrino favorável nessas mulheres (revisado em Zondervan *et al.*, 2018).

A EDT é considerada uma doença estrogênio dependente (Bulun, 2009), uma vez que esse hormônio contribui para o crescimento celular (revisado em Zondervan *et al.*, 2018). A enzima aromatase (que converte androgênio em estrogênio) está ausente no endométrio de mulheres saudáveis (Baxendale e Reed, 1981). Porém, nas mulheres com EDT, há altos níveis da enzima aromatase e baixos níveis da enzima 17-beta-hidroxi-esteróide-desidrogenase-22 (conversora de estradiol em estrona), tanto no tecido endometrial eutópico como no ectópico. Como consequência, há um nível maior de estrogênio nesses locais. Essa alta concentração de estrogênio, associada ao aumento de receptores de estrogênio (Bulun, 2009), ativam genes envolvidos na proliferação celular, tais como GREB1, MYC (*c-myc*, família de proto-oncogenes que codifica uma fosfoproteína nuclear com papel na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular) e CCND1 (do inglês, *Cyclin D1*; gene que codifica uma proteína que funciona na regulação de Cinasas Dependentes de Ciclina (CDK)), no ciclo celular.

A maior presença de estrogênio em tecido endometrial ectópico, além de favorecer a proliferação de células endometriais, estimula a produção de prostaglandinas, pela ativação da enzima cicloxigenase 2 (COX 2, do inglês, *Cyclo-Oxygenase 2*), que pode estimular ainda mais a aromatase, contribuindo para a manutenção dos implantes endometrióticos e para a manutenção de ambiente inflamatório (Attar e Bulun, 2006). A produção excessiva de estrogênio também tem ação na resposta imune, contribuindo para a inibição da fagocitose por macrófagos, as principais células responsáveis pela eliminação dos restos celulares na cavidade peritoneal (Sidell *et al.*, 2002). O estrogênio age em várias vias de sinalização do macrófago, influenciando, em particular, naquelas relacionadas à habilidade de manter o recrutamento de células inflamatórias e no remodelamento de tecidos inflamados [MPAK, do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*, proteína quinase ativada por mitógeno (Seval *et al.*, 2006), PI3K/AKT, do inglês, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, fosfatidilinositol-3 quinase/proteína quinase B) (Kayisli *et al.*, 2004) e NF-κB (do inglês, *Nuclear Factor Kappa-*

*light-chain-enhancer of activated B cells*, fator nuclear kappa) (McKay e Cidlowski, 1999)]. Sua desregulação pode ter, como consequência, a sobrevivência de células ectópicas e a promoção da vascularização das lesões (revisado em Cakmak *et al.*, 2009).

As disfunções hormonal e imunológica, na EDT, caminham juntas, uma vez que além dos macrófagos, diversas células imunes, como linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos e neutrófilos também expressam o receptor funcional de estrogênio, GPER1 (do inglês, *G Protein-coupled Estrogen Receptor 1*, receptor 1 de estrogênio acoplado à proteína G) (Notas *et al.*, 2020).

Além da produção local de estrogênio, a resistência à progesterona presente nas mulheres com endometriose, pode contribuir para a fisiopatologia da doença. Foram observados baixos níveis de receptores de progesterona e a ausência da sua isoforma B, tanto no endométrio eutópico (Burney *et al.*, 2007), como no ectópico (Bulun *et al.* 2006), quando comparados às mulheres saudáveis. A desregulação da expressão dos receptores de progesterona, ou mesmo alterações nas vias de sinalização causam resistência à progesterona em até 30% das mulheres com EDT (Vercellini *et al.*, 2013). Neste caso, a diminuição da ação de progesterona, que tem impactos anti-inflamatórios (Bulun *et al.*, 2006), também parece contribuir para a sobrevida/implantação de implantes endometriais e para a manutenção de inflamação local.

Em resumo, alterações hormonais também podem contribuir no aumento da capacidade de células endometriais ectópicas proliferarem, no aumento da adesão ao mesotélio peritoneal (revisado em Ahn *et al.*, 2015) e/ou na diminuição da capacidade do sistema imune em eliminar essas células da cavidade peritoneal (Sidell *et al.*, 2002).

A sobrevivência dos implantes endometrióticos na parede peritoneal depende do suprimento sanguíneo para o fornecimento de oxigênio e nutrientes às lesões em desenvolvimento. As lesões endometrióticas são altamente vascularizadas, indicando que a angiogênese e/ou a vasculogênese devem estar envolvidas no sucesso da sua implantação (Nisolle *et al.*, 1993). Análoga ao processo de vascularização dos tumores, a EDT pode utilizar de mecanismos de angiogênese e vasculogênese, que contribuem no estabelecendo de uma rede vascular própria e na sua manutenção (revisado em Ahn *et al.*, 2015). Assim, as lesões endometrióticas se estabelecem em microambiente onde os mediadores inflamatórios se mantêm presentes.

Considerando-se que o endométrio humano normal sofre proliferação, diferenciação e regeneração a cada ciclo menstrual, há atividade angiogênica inata, sob regulação do estrogênio, de forma que juntamente com o crescimento endometrial, ocorre proliferação e regeneração também da vasculatura endometrial, a cada ciclo (revisado em Ahn *et al.*, 2015). Esse processo fisiológico parece estar desregulado na EDT, uma vez que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose apresenta maior densidade de microvasos, maior expressão de VEGF-A (fator de crescimento vascular endotelial A) no epitélio glandular e de VEGFR-2 (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*, receptor do fator de

crescimento vascular endotelial 2) nos vasos sanguíneos. Tais fatores corroboram o envolvimento de angiogênese e neovascularização de lesões, contribuindo no estabelecimento da doença (Bourlev *et al.*, 2006). Além disso, VEGF atua como um fator de sobrevivência, prevenindo a morte apoptótica de células endoteliais microvasculares (Watanabe e Dvorak, 1997).

Ainda outros elementos importantes na fisiopatologia da endometriose envolvem a maior capacidade de adesão dos fragmentos endometriais, descrita na EDT bem como concentrações elevadas de MMP e do ativador do plasminogênio, no endométrio eutópico de mulheres com EDT (Klemmt *et al.*, 2007). Em conjunto, esses dados sugerem haver aumento da proteólise dos fragmentos endometriais que saem para a cavidade peritoneal, via menstruação retrógrada, facilitando o estabelecimento como lesões endometrióticas (Gilabert-Estellés *et al.*, 2003). De fato, níveis de MMP-9, que também tem atividade imunorreguladora (Lavini-Ramos *et al.*, 2017) estão elevados em amostras de soro de mulheres com EDT (Becker *et al.*, 2010). A MMP-9 degrada o colágeno e a elastina, induz a neovascularização, acelera a expansão das células endoteliais vasculares e aumenta o fluxo sanguíneo (De Sanctis *et al.*, 2011).

Ainda no contexto de ação de MMPs na fisiopatologia da EDT, o mecanismo de desenvolvimento embrionário, transição epitélio-mesênquima, ou transição mesênquima-epitélio é reconhecido como mais um componente na fisiopatologia da EDT. Esse tipo de alteração tecidual ocorre num contexto de inflamação crônica, onde células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal invasivo (com modificações na expressão de moléculas de adesão como perda de E-caderina e ganho de N-caderina), com aumento de fator de crescimento e da expressão de metaloproteinase de matriz, facilitando a proliferação celular (revisado em Zondervan *et al.*, 2018). A transição epitélio-mesênquima também é considerada, dentre os mecanismos ativos sem células tumorais durante a invasão celular e metástase (Orlichenko e Radisky, 2008). No entanto, não há estudos que indiquem, exatamente, que tipo de transição epitélio-mesênquima ocorre na EDT (Yang e Yang, 2017). Foi observado que estímulos, como hipóxia e estrogênio, podem, por diferentes vias, ativar esse processo na doença, envolvendo fatores como TGF- $\beta$  e a via da sinalização, Wnt, estimulando a proliferação e migração celular (Yang e Yang, 2017).

Outros mecanismos discutidos como importantes no estabelecimento e progressão da EDT são relacionados às disfunções do sistema imune dessas mulheres, considerado incapaz de reconhecer e/ou montar uma resposta imune efetora adequada e eliminar os fragmentos de endométrio na cavidade pélvica. É possível que os próprios fragmentos endometriais também adquiram a capacidade de evasão da resposta imune, quando na cavidade pélvica, havendo, provavelmente, uma combinação de fatores imunológicos e endometriais alterados na doença (revisado em Ahn *et al.*, 2015).

As alterações imunológicas já relatadas nas mulheres com EDT incluem tanto disfunções da imunidade mediada por células como na imunidade humoral. No contexto

humoral, foram observados depósitos de IgG e de Fator 3 do sistema complemento (C3) no endométrio eutópico de pacientes com endometriose, com correspondente diminuição dos níveis de complemento total no soro (Weed e Arquembourg, 1980), indicando a ocorrência de ativação da cascata do complemento. Também foi observada maior expressão gênica e proteica de vários componentes do sistema complemento em mulheres com EDT, em relação ao endométrio normal de mulheres controles (CTRs) (Suryawanshi *et al.*, 2014). Dentre eles, o fator 7 do complemento (C7), considerado altamente expresso, além do fator B, D, H e MASP1 (do inglês, *mannose-associated serine protease 1*, serina-protease associada à manose). A maioria das proteínas do complemento tem expressão em células epiteliais glandulares endometrióticas, sugerindo que a ativação do sistema complemento pode ser, inicialmente, um processo envolvido na eliminação de células endometrióticas, mas sem eficácia, e que, possivelmente contribui para o processo de inflamação crônica da EDT, como já descrito em outras doenças (revisado em Ricklin *et al.*, 2010).

Ainda em relação a alterações humorais, foi observada uma maior frequência de reconhecimento de antígenos endometriais (extrato tecidual eutópico e ectópico) por anticorpos IgG, presentes tanto no soro como no fluido peritoneal (FP), de mulheres com EDT, em relação a mulheres saudáveis (Mathur *et al.*, 1990). Há também descritos maiores níveis de autoanticorpos contra fosfolípidos, histonas, polinucleotídeos (Gleicher *et al.*, 1987) e músculo liso (Taylor *et al.*, 1991) em relação a mulheres CTRs, sem a doença. Estes achados sugerem haver uma maior exposição de autoantígenos no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com EDT desencadeando processos de autoimunidade patológica, possivelmente, compondo a fisiopatologia da doença. Assim, o excesso de proteínas endometriais em localização extrauterina, poderia contribuir para uma resposta autoimune inflamatória, na EDT. Apesar desses achados, indicando a ocorrência de resposta imune humoral dirigida a autoantígenos e ativação da cascata do complemento, sugerindo um componente de autoimunidade patológica, na EDT, não se sabe, ao certo, o quanto o processo autoimune é importante na fisiopatologia da EDT.

Enquanto alguns estudos, como os acima citados, focam no conceito de EDT com características de autoimunidade patológica, cada vez mais acumulam-se dados também mostrando alterações na função de diversas células do sistema imune. Diversos estudos indicam que a vigilância imunológica nas mulheres com EDT está prejudicada e que as células do sistema imune, tanto as residentes, como as recrutadas para a cavidade abdominal, parecem ser incapazes de responder de forma adequada à permanência de células endometriais ectópicas, tanto em relação ao seu reconhecimento, como quanto à sua eliminação (Dmowski e Braun 2004; Herington *et al.*, 2011). Nesse sentido, destacamos que as células da resposta imune inata estão intensamente envolvidas na patofisiologia da doença, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK (Symons *et al.*, 2018).

Os neutrófilos, as células primárias da resposta imune inata a serem recrutadas para locais com inflamação – infecção e/ou dano tecidual (Petri e Sanz, 2018), no contexto da EDT, são encontrados numa maior frequência no fluido peritoneal dessas pacientes, em relação às mulheres sem a doença (Tariverdian *et al.*, 2009). Este achado é, possivelmente, resultado de concentrações elevadas de citocinas, como a IL-8, com função quimiotática para neutrófilos, no plasma e fluido peritoneal de mulheres com EDT quando comparado aos de mulheres CTRs, sem a doença (Monsanto *et al.*, 2016).

Células como macrófagos, DCs e mastócitos contribuem para a resposta inflamatória inicial, participando na eliminação das células ectópicas, mesmo que de forma insuficiente, dando início à reparação do tecido peritoneal que sofreu injúria (Herington *et al.*, 2011). A fagocitose por macrófagos é auxiliada por metaloproteinases de matriz (MMP) e pela expressão do receptor *scavenger*, CD36, promovendo a degradação (Osteen *et al.*, 2003) e eliminação de restos celulares (Febbraio *et al.*, 2001), que chegam na cavidade abdominal. Embora o número de macrófagos seja maior no líquido peritoneal (Hill *et al.*, 1988) e no endométrio eutópico (Berbic *et al.*, 2009) de mulheres com EDT, em comparação com mulheres CTRs, esses macrófagos apresentam uma redução na expressão e atividade da MMP-9 (Wu *et al.*, 2005) e redução de expressão do receptor CD36 (de Villiers *et al.*, 1994). Como consequência, ocorre uma diminuição da capacidade fagocítica e de degradação de detritos por esses macrófagos (Chuang *et al.*, 2009; Halme *et al.*, 1984). A presença de macrófagos ativados na cavidade peritoneal, independentemente de sua capacidade fagocítica, contribui para as maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas, já observadas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, em relação às mulheres CTRs. São descritos níveis maiores de MIF (do inglês, *Macrophage migration Inhibitory Factor*) (Kats *et al.*, 2002), TNF- $\alpha$  (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*) (Eisermann *et al.*, 1988), Interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6 (Harada *et al.*, 1997), IFN- $\gamma$  (do inglês, *Interferon gamma*) (Podgaec *et al.*, 2007; Bellelis *et al.*, 2019), IL-8, RANTES, MCP-1 (do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) (Akoum *et al.*, 1996), IL-7 e IL-15 (Bellelis *et al.*, 2019).

Em condições fisiológicas, os macrófagos participam da eliminação de resíduos celulares provenientes da menstruação, bem como da regeneração de tecidos e angiogênese (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019). Macrófagos M2, com propriedade anti-inflamatória são predominantes na condição fisiológica, indicando que o endométrio eutópico em mulheres saudáveis apresentam um ambiente anti-inflamatório, que permite a implantação do embrião. No entanto, na EDT, a principal população de macrófagos no endométrio eutópico são os M1, com propriedade pró-inflamatória, conferindo, portanto, um microambiente endometrial com característica mais inflamatória, nessas mulheres (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019). Além disso, diferentemente de DCs, os macrófagos não aumentam na fase secretora do ciclo, contribuindo para a manutenção de restos endometriais, que podem sobreviver e migrar para a cavidade peritoneal, favorecendo sua implantação e desenvolvimento de lesões ectópicas (revisado em Vallvé-Juanico *et al.*, 2019).

As células dendríticas, DCs, com função relevante na apresentação de antígenos e na modulação da resposta imune dependente de linfócitos T, também apresentam alterações funcionais nas mulheres com EDT. As DCs imaturas (CD1a+) que, em geral, têm predomínio de atividade imunorreguladora, estão em maior densidade nas lesões peritoneais, quando comparada à densidade observada no tecido peritoneal, livre de lesão das mesmas mulheres, ou ao tecido peritoneal de mulheres sem EDT, no qual estão ausentes (Schulke *et al.*, 2009). Essas mesmas DCs avaliadas no endométrio eutópico das mulheres com EDT, apresentam-se em maior densidade na camada basal do endométrio durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, em comparação com as mulheres CTRs, sem a doença, na mesma fase do ciclo. As DCs maduras (CD83+), com alta capacidade de apresentação antigênica, têm uma significativa menor densidade no endométrio eutópico de mulheres com EDT, tanto na camada basal como na funcional, em relação às mulheres saudáveis, em todas as fases do ciclo (Schulke *et al.*, 2009). Essas alterações sugerem uma possível alteração primária da função imune já no endométrio eutópico das mulheres com EDT, com uma menor capacidade de apresentação antigênica e ativação da função efetora linfocitária.

A fisiopatologia da EDT, pode ainda envolver células T reguladoras (Treg), que têm funções no controle da resposta imune inflamatória. Estas células produzem citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF- $\beta$  (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*) (Nandakumar *et al.*, 2009), podendo atuar na inibição da ativação de macrófagos, da proliferação de células T e B, na função de DCs e NKs, além da redução da atividade das células T efetoras (Sakaguchi *et al.*, 2006), tendo importante função na manutenção da tolerância ao próprio. Foi observado um maior número de células Treg que expressam o fator de transcrição FOXP3 (do inglês, *forkhead Box P3*) no endométrio eutópico (imunohistoquímica) nas mulheres com EDT na fase proliferativa precoce e durante toda a fase secretora do ciclo menstrual, em comparação às mulheres saudáveis (Berbic *et al.*, 2010). Esse dado sugere que no microambiente do endométrio eutópico das mulheres doentes haja uma menor capacidade efetora de células T envolvidas no reconhecimento de antígenos endometriais que chegam à cavidade peritoneal, permitindo sua sobrevivência e facilitando sua implantação em sítios ectópicos. Também há relatos de maiores níveis de IL-10 e IL-4 no fluido peritoneal de mulheres com EDT, em relação a mulheres CTRs saudáveis, além de razões de citocinas anti-inflamatórias/pró-inflamatórias (regula/inflama) IL-4/IFN- $\gamma$ , IL-4/IL-2, IL-10/IFN- $\gamma$ , IL-10/IL-2 (Podgaec *et al.*, 2007). Esses dados indicam que, além da presença de um perfil inflamatório de resposta imune (Th1), citocinas com perfil, predominantemente, imunorregulador (Th2) também participam da fisiopatologia da EDT.

A presença deste perfil regulador é também corroborada por outro estudo que identificou a presença de um maior número de células com fenótipo, predominantemente, regula, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, no fluido peritoneal de mulheres com EDT, com maior expressão de mRNA de Foxp3 nestas células (Podgaec *et al.*, 2012), em relação às mulheres sem a doença. Além disso, a expressão de mRNA para as citocinas com padrão regulador, IL-4 e IL-

10 mais elevada em linfócitos, tanto do sangue periférico como do tecido endometrial, em mulheres com EDT em relação a mulheres CTRs, sem a doença (Antsiferova *et al.*, 2005). Corroborando este achado, há relatos de uma predominância de IL-4 e IL-10 no FP de mulheres com EDT profunda (Podgaec *et al.*, 2010), refletindo a ativação de mecanismos imunorreguladores, provavelmente, de forma descontrolada, gerando uma condição de imunossupressão com prejuízo na resposta imune efetora no sítio de acometimento da doença.

Além das células acima citadas com possível envolvimento no estabelecimento e progressão da EDT, especial atenção tem sido dirigida à contribuição de células NK na resposta imune na EDT e, mais especificamente, ao seu envolvimento no escape imunológico dos fragmentos endometriais ectópicos da cavidade peritoneal (Thiruchelvam *et al.*, 2015). Vários estudos descrevem alterações funcionais e/ou fenotípicas, tanto local (microambiente da lesão) (Oosterlynck *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2002) como sistêmicas (Wilson *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 2002), de células NK, na EDT, porém os mecanismos associados a tais alterações na doença ainda são objeto de investigação.

### 1.3 Células *Natural Killer* na endometriose

As células NK compreendem, aproximadamente, 10-15% dos linfócitos circulantes, e apresentam papel importante na resposta imune inata. São caracterizadas pelo fenótipo CD3-CD56<sup>+</sup> (CD3, marcador específico para linfócitos T; CD56; isoforma da molécula de adesão neural). Podem ainda ser subdivididas, fenotipicamente, em duas subpopulações distintas, CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, com base na densidade de CD56 (bright, alta expressão, e dim, baixa expressão) na superfície celular (Fehniger *et al.*, 2003). A subpopulação CD56<sup>dim</sup> compreende cerca de 90% das células NKs circulantes, sendo consideradas maduras e, predominantemente, citotóxicas e produtoras de citocinas após estimulação com células-alvo (Caligiuri, 2008). A subpopulação CD56<sup>bright</sup> é, geralmente, considerada mais proliferativa, e com capacidade para a produção de citocinas após estimulação com IL-12 e IL-18, mas com uma baixa atividade citotóxica em repouso (Caligiuri, 2008). As células CD56<sup>bright</sup> (Fehniger *et al.*, 2003) podem deixar os vasos sanguíneos e se constituírem como a maioria das células NK encontradas dos nódulos linfáticos ou em tecidos decíduais de mulheres grávidas. Nesses tecidos decíduais constituem cerca de 70% dos linfócitos da decídua no primeiro trimestre, com papel na promoção da angiogênese na gravidez (Zhang *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que as células NK CD56<sup>bright</sup> sejam derivadas de células precursoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> e dêem origem às células CD56<sup>dim</sup>, uma vez que são as que aparecem primeiro após o transplante de células tronco hematopoiéticas e em modelos de diferenciação de NK, *in vitro*, com estímulo de citocinas (revisado em Freud e Caligiuri, 2006).

A expressão de CD57, em células CD56<sup>dim</sup>, está associada à maturação e função das células NK, que inclui alta atividade citolítica e produção de citocinas. Ademais, células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> produzem IFN- $\gamma$  e têm atividade citotóxica mais potente quando estimuladas via CD16 (Lopez-Vergès *et al.*, 2010).

A atribuição clássica de funções para as células CD56<sup>dim</sup>, como, predominantemente, citotóxicas e CD56<sup>bright</sup>, como produtoras de citocinas, tem sido alvo de debate, uma vez que há estudos mostrando respostas citotóxicas aumentadas de células NK CD56<sup>bright</sup> após estimulação com citocinas, bem como ampla produção de citocinas por células NK CD56<sup>dim</sup> após o reconhecimento de ligantes em células alvo ou anticorpos (Freud *et al.*, 2017). Em estudo recente (Schwane *et al.*, 2020) confirmou-se, por meio de agrupamento hierárquico não supervisionado, a identificação de 70 moléculas com expressão diferencial no repertório de receptores de células NK CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, os quais foram associados a várias funções das células NK.

As células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> podem, ou não, apresentar a molécula CD16 (Fc $\gamma$ R11A, receptor para a porção Fc da imunoglobulina G, IgG) cuja ligação com IgG promove citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC, do inglês, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Caligiuri, 2008). Células NK maduras circulantes (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) apresentam uma potente função efetora via ADCC (revisado em Morvan e Lanier, 2016).

Células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> são as mais citotóxicas e também as mais frequentes no sangue periférico (90-95%) (Campbell *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2001a). Mediadas por quimiocinas, podem seguir para tecidos periféricos durante as respostas inflamatórias, liberando perforina e granzima capazes de induzir, rapidamente, citotoxicidade (Campbell *et al.*, 2001). A menor frequência de NK no sangue (5-10%) são das células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>. Elas expressam receptores de endereçamento (*homing*) para locais periféricos inflamados, que exercem uma baixa citotoxicidade (Campbell *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2001b).

Com base na densidade de expressão na superfície celular, de forma geral, são definidas cinco subpopulações de células NK no sangue periférico humano: 1) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (50-70% das células CD56<sup>bright</sup>), 2) CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> (30–50% das células CD56<sup>bright</sup>), 3) CD56<sup>+/dim</sup>CD16<sup>-</sup>, 4) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e 5) CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (Poli *et al.*, 2009).

As células NK não expressam receptores de antígenos específicos de células T ou B (Vivier e Ugolini, 2009). Apresentam distribuição normal restrita, principalmente, ao sangue periférico, medula óssea, baço e fígado e, em condições fisiológicas, com frequência restrita em linfonodos ou órgãos linfáticos, migrando para esses locais nas fases iniciais de processos inflamatórios (Dogra *et al.*, 2020). Consideradas como membro da recém-descoberta família das células linfóides inatas (ILC, do inglês, *Innate Lymphoid Cell*), as células NK foram reclassificadas como ILC-1 (Vivier *et al.*, 2018), sendo caracterizadas, predominantemente, por sua atividade citotóxica e pela produção da citocina IFN- $\gamma$ . No

entanto, diferentemente dos linfócitos TCD8+ citotóxicos, exercem sua função citolítica sem a necessidade de ativação prévia (Moretta *et al.*, 2002).

Após a firme adesão da célula NK à célula-alvo, ocorre a formação de uma sinapse imunológica, onde os grânulos citotóxicos (vesículas lisossomais) são, então, polarizados em direção à sinapse, fundindo-se com a membrana da célula NK (Orange, 2008). O mecanismo de indução de morte da célula alvo envolve a degranulação desses grânulos que contêm proteínas tóxicas, perforina e granzima, e as proteínas de membrana associadas aos lisossomas-1 (LAMP1, do inglês, *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*, ou CD107a), LAMP2 (CD107b) e LAMP3 (CD63) (Peters *et al.*, 1991). As perforinas criam poros na membrana celular da célula alvo e, com a posterior liberação da proteína citotóxica, granzima, é desencadeada a morte celular por apoptose, por diferentes vias (revisado em Prager e Watzl, 2019). As granzimas induzem a ativação de caspases, disfunção mitocondrial, ou apoptose independente de caspases. Dentro desses grânulos, as granzimas formam complexos com o proteoglicano serglicina, mantendo-se inativas em função dos baixos, pH e concentração de cálcio e, desta maneira, protegendo as células NKs (e/ou TCD8+) de danos por seus grânulos tóxicos (revisado em Prager e Watzl, 2019).

Nas células citotóxicas, NK e TCD8+, CD107a (LAMP-1) é considerada a proteína mais abundante nessas vesículas intracelulares. Dessa forma, a análise da expressão de CD107a é considerada uma medida de degranulação de vesículas intracelulares por essas células (Alter *et al.*, 2004). Algumas doenças são descritas como associadas a um mecanismo deficiente de degranulação (Marcenaro *et al.*, 2006; Shabrish *et al.*, 2019). Em pacientes com anemia de Falconi, foi observada deficiência na expressão de CD107a por células NK estimuladas, em relação à expressão em CTRs saudáveis, que, associada a uma menor citotoxicidade dessas células e a altos níveis de IFN- $\gamma$ , sugere haver uma relação com a hiperinflamação descrita na doença (Shabrish *et al.*, 2019).

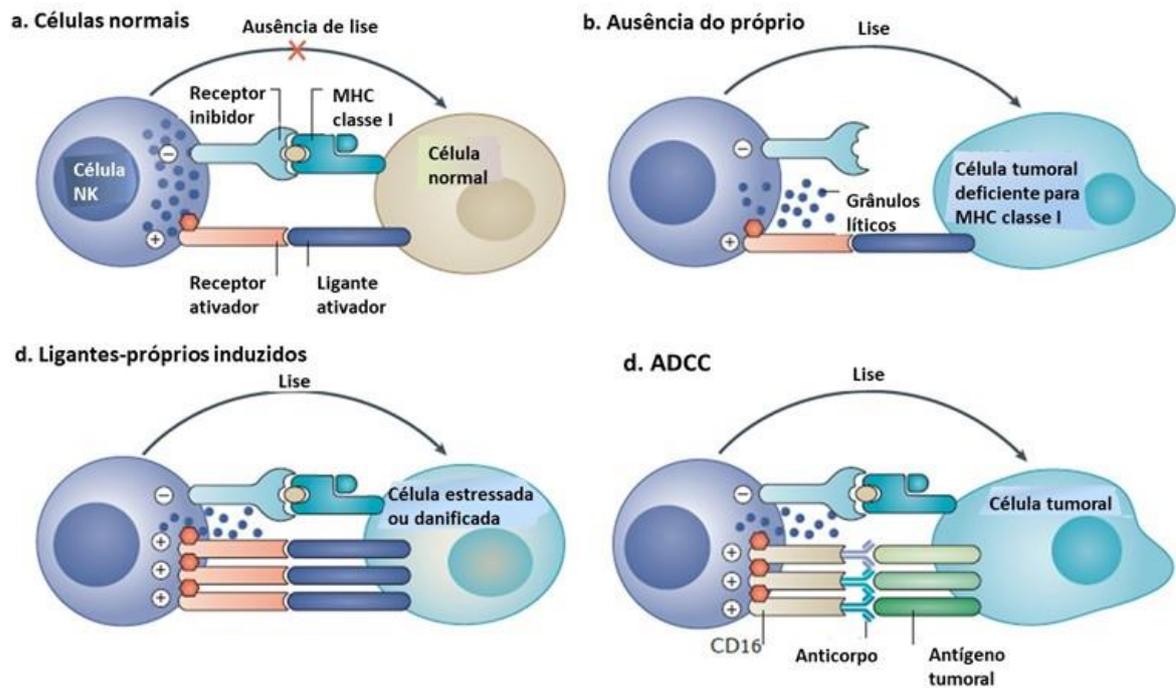
Além da degranulação dos grânulos líticos, a morte de células alvo por células NK também pode ocorrer por meio de receptores de morte, expressos na superfície de células NK: FasL (do inglês, *Fas Ligand*, Fas ligante) e TRAIL (do inglês, TNF- *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral), que se ligam aos receptores Fas e TRAIL-R1 e/ou -R2, respectivamente, nas células alvo. Como resultado dessa ligação, ocorre ativação de caspases, disfunção mitocondrial e apoptose da célula alvo (revisado em Prager e Watzl, 2019).

A ação das células NK é fortemente regulada por ações integradas entre sinais inibidores e ativadores, e mediada pela ligação entre esses receptores, presentes em sua superfície celular, com seus ligantes, presentes na célula alvo (Cooper *et al.*, 2001a) (Figura 1).

Os receptores inibidores expressos nas células NK (Figura 2) possuem um imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*), presente no domínio citoplasmático dessas moléculas. Segundo a teoria do

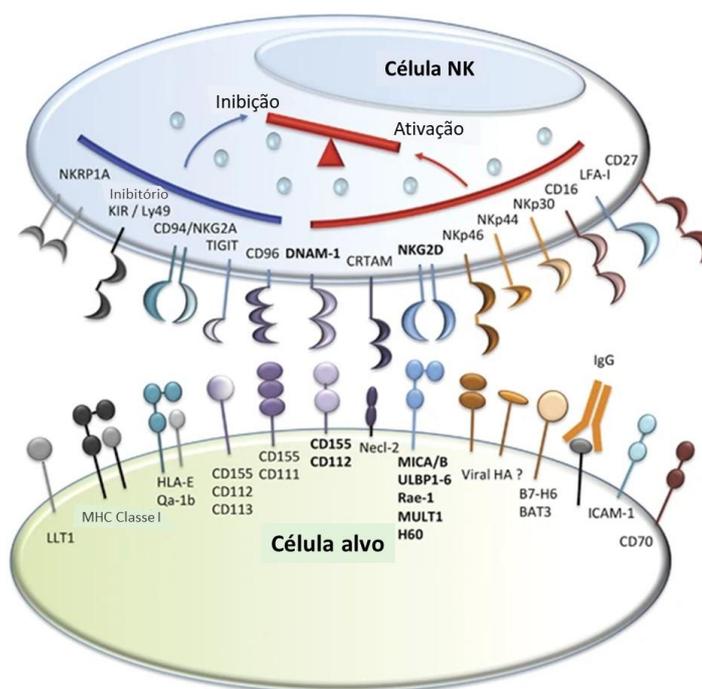
“*missing-self*” (ausência do próprio) (Ljunggren e Kärre, 1990), na presença de moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I próprias (HLA-A, B, -C), resíduos de tirosina dos motivos ITIM sofrem fosforilação, frequentemente, por uma quinase da família Src, mantendo alta afinidade de ligação de receptores inibidores. A presença de fosfatases “desliga” os receptores ativadores e o desfecho final é a ausência de ativação das células NK (Lanier, 1998) (Figura 1). Os principais receptores inibidores envolvidos nesse processo são os receptores inibidores da família KIR (*Killer Immunoglobulin like Receptor*), que é altamente polimórfica e também inclui receptores ativadores (Middleton *et al.*, 2002). Além dos receptores KIR, outros receptores inibidores também são expressos em células NK como CD94/NKG2A, membro A da família de receptores de lectina tipo C (do inglês, *C-type lectin receptor*), receptores leucócitos Ig-like (LIRs, do inglês, *Leukocyte Ig-like Receptors*,) e os transcritos Ig-like (ILTs) (*Ig-like transcripts*), que reconhecem moléculas HLA classe I não clássicas expressas nas células (molécula próprias, *self*) (revisado em Morvan e Lanier, 2016). Além dos receptores KIR inibitórios, o receptor NKG2A, que reconhece a molécula não clássica, HLA-E, também está envolvido na educação de células NK, um processo de maturação funcional que permite a inibição de células NK, quando do reconhecimento do próprio (*self*) (Anfossi *et al.*, 2006).

Na ausência ou diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I (células identificadas como “não-próprias”, “*missing-self*”) para ligação com receptores inibidores KIR, como ocorre, frequentemente, na infecção viral ou na transformação maligna, as células NK são ativadas, ocorrendo a lise da célula alvo (Kärre *et al.*, 1986) (Figura 1). Uma outra forma de ativação de células NK pode ocorrer quando há uma super expressão de ligantes próprios em células alvo (“*induced self*”), como na condição de estresse biológico (como tumor, infecção). Neste caso, esses ligantes podem ser reconhecidos pelos receptores ativadores em células NK, sobrepondo os sinais inibitórios e induzindo a lise das células-alvo. Além disso, anticorpos específicos ligados a antígenos em células alvo, podem ainda se ligar ao receptor CD16, em células NK, induzindo a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (revisado em Morvan e Lanier, 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Representação esquemática das principais funções das células NK, no contexto de células saudáveis e tumorais/estressadas. A)** Um equilíbrio de sinais entre os receptores inibidores e ativadores regula o reconhecimento de células saudáveis, por células *natural killer*(NK); **B)** As células tumorais que regulam negativamente a expressão das moléculas HLA de classe I são detectadas como "ausência do próprio" (ausência do próprio, "*missing-self*") e são lisadas por células NK; **C)** As células tumorais/estressadas podem superexpressar ligantes induzidos por estresse (ligantes próprios induzidos, "*induced-self*"), reconhecidos por receptores ativadores em células NK, que anulam os sinais inibitórios e induzem a lise das células-alvo; **D)** Anticorpos específicos a antígenos tumorais ligam-se à molécula CD16 e induzem citotoxicidade mediada por células NK dependente de anticorpos (ADCC). Adaptada de Morvan e Lanier, 2016.

Além dos receptores KIR ativadores, dentre os receptores ativadores expressos em células NK, destacamos o receptor NKG2D, membro da família de receptores semelhantes à lectina tipo C (*C type lectin family*; que inclui CD94/NKG2C, CD94/NKG2E, CD94/NKG2F), a família dos receptores de citotoxicidade natural (NCR, do inglês, *Natural Cytotoxicity Receptors*), incluindo os receptores NKp30, NKp44 e NKp46, e o receptor para Fc IgG, CD16 (revisado em Morvan e Lanier, 2016) (Figura 2).



**Figura 2. Principais receptores inibidores e ativadores nas células NK, e seus ligantes em célula alvo.** BAT3, transcrito 3 associado ao antígeno leucocitário humano (HLA) -B; CRTAM, molécula associada às células T restritas à molécula HLA de classe I; HA, hemaglutinina; HLA-E, moléculas de histocompatibilidade HLA de classe I, cadeia alfa E; IgG, imunoglobulina G; LFA-1, antígeno-1 associado à função leucocitária; LLT1, transcrito 1 tipo lectina; TIGIT, imunoglobulina de células T e domínio ITIM. Adaptado de Chan *et al.*, 2014.

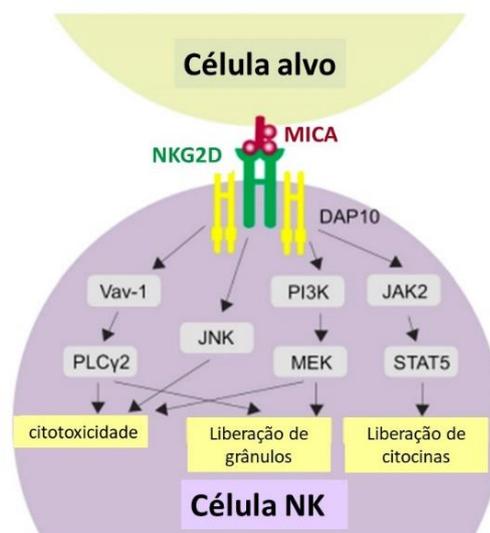
Há dois tipos de receptores CD16. O CD16 do tipo A (FC $\gamma$ RIII A) é expresso em células NK (Selvaraj *et al.*, 1989), monócitos (Passlick *et al.*, 1989), macrófagos (Perussia e Ravetch, 1991) e trofoblastos placentários (Nishikiori *et al.*, 1993) na forma de uma proteína transmembranária ancorada em polipeptídeo. O CD16 do tipo B (FC $\gamma$ RIII B) é expresso em neutrófilos, com domínios extracelulares homólogos ao CD16A, mas diferenciados pela ligação com glicosilfosfatidilinositol (Romee *et al.*, 2013). Após a ligação da molécula CD16 com a porção Fc dos anticorpos IgG, na superfície da célula alvo, há indução de uma série de sinais intracelulares, resultando em atividade efetora citotóxica, por meio de ADCC.

O receptor de ativação CD16A em células NK (daqui em diante descrito apenas como CD16) do sangue periférico é expresso uniformemente, quase que exclusivamente, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>; as células CD56<sup>bright</sup> expressam pouco, ou, não expressam, CD16 (Romee *et al.*, 2013). Após a estimulação por mitógenos, e também em cocultura com células alvo tumorais, pode ocorrer regulação negativa da molécula CD16, mediada pela desintegrina e metaloprotease ADAM17 (*Tumor Necrosis Fator - TNF- converting enzyme*, ou TACE), uma enzima envolvida na clivagem de L-selectina (Romee *et al.*, 2013). Tal processo pode ser importante para a modulação da expressão de CD16, com possível comprometimento da função efetora das células NK, via ADCC.

O receptor tipo lectina (do inglês, *lectin-like*) NKG2D (do inglês, *natural-killer group 2, member D*), expresso em células NKs, TCD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> e T $\gamma\delta$  (Pardoll, 2001). NKG2D tem como

ligantes as moléculas MICA e B (*Major Histocompatibility Class I Chain-related A e B*, molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I relacionadas) e ULBP1 e 2 (*UL16-binding protein*, proteína ligadora UL-16), expressas, predominantemente (mas não exclusivamente), em células epiteliais ou em células em situação de estresse (“*induced-self*”) (Diefenbach e Raulet, 2001) (Figura 2). Como acima citado, a sinalização gerada pela ligação de NKG2D com esses novos ligantes próprios, mesmo na presença da ligação HLA-próprio-receptor inibidor, suplanta os níveis de inibição, ativando as células NK (Moretta *et al.*, 2002). Essa ativação funcionaria como um sistema de reserva, frente à maior demanda funcional de células NK, em caso de estresse celular, tendo o receptor NKG2D um papel essencial na citotoxicidade (Bauer *et al.*, 1999) e na indução de produção de IFN- $\gamma$  (revisado em Zwirner *et al.*, 2007) por células NK (Figura 3).

Em semelhança a outros receptores da família CD94/NKG2, o receptor NKG2D apresenta-se na forma de um homodímero (Figura 3), com um curto domínio intracitoplasmático sem propriedade de sinalização (Raulet, 2003). Cada homodímero de NKG2D se liga a dois homodímeros da proteína ativadora de DNAX, de 10 kDa (DAP10, do inglês, *DNAX-activating Protein 10*) e, por meio de uma arginina carregada positivamente nesse domínio, NKG2D se liga a um ácido aspártico, carregado negativamente, no domínio transmembranário da molécula DAP10 (Garrity *et al.*, 2005). DAP10 possui um motivo baseado em tirosina YxxM que recruta e ativa a subunidade p85 da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) e a proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (Grb2, do inglês, *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*). Sugere-se que esta cascata de sinalização seja a principal responsável pela citotoxicidade e/ou sobrevivência das células alvo por células NK (Bauer *et al.*, 1999). Uma das hipóteses para a variabilidade de ligantes para esse receptor (NKG2DL), expressos em condição de estresse, é que a diversidade de ligantes reduziria as chances de escape imunológico das células alvo (Diefenbach *et al.*, 2003). Embora a expressão de NKG2D esteja, especialmente, associada à atividade citotóxica por células NK, ela também pode funcionar como uma molécula coestimuladora, em células citotóxicas T CD8+, e não apenas um mediador direto de citotoxicidade (Diefenbach *et al.*, 2002).



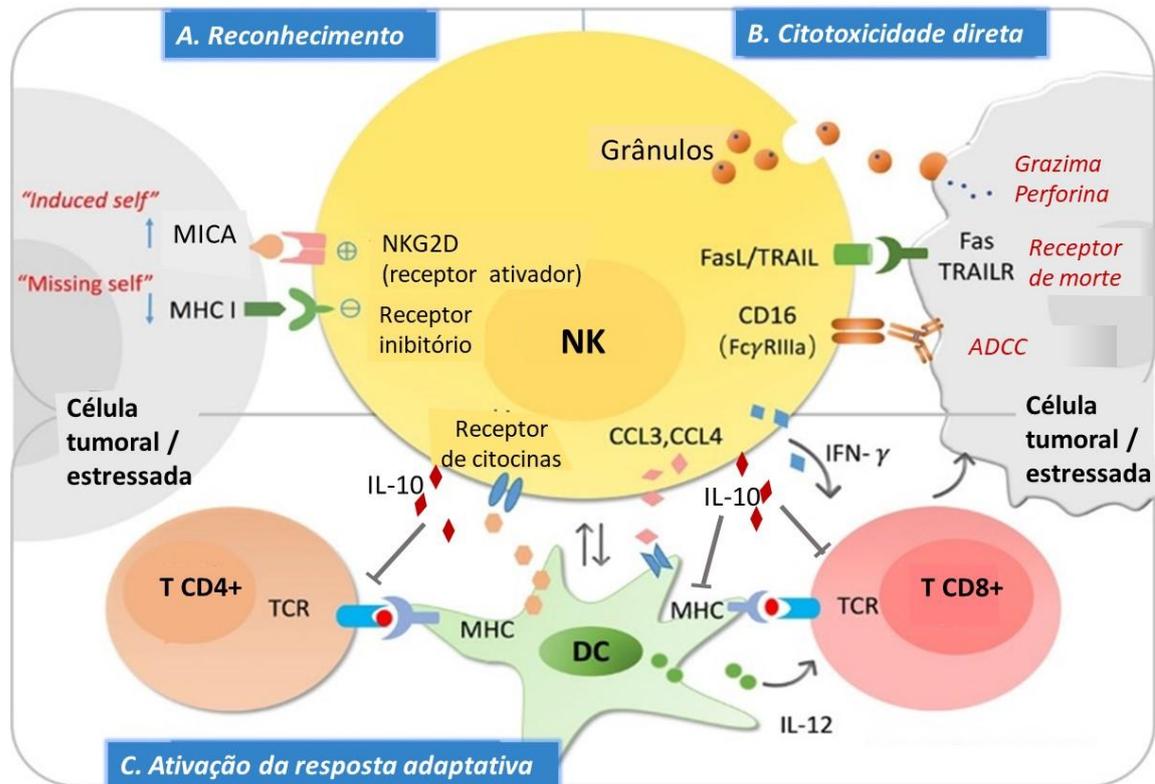
**Figura 3. Ativação de vias relacionadas ao receptor NKG2D.** A ligação de NKG2D com seu ligante, na célula alvo, ativa várias vias moleculares em células NK, que são mediadas pela molécula de sinalização DAP10. A citotoxicidade de células NK podem ser ativadas por meio da fosfolipase C Gama 2 (PLC2), c-Jun-NH (2) - terminal quinase (JNK) e fosfatidilinositol 3-hidroquinase PI3K. A liberação de grânulo é ativada pelas vias PLC2 e PI3K. A via JAK-STAT5 (Transdutor de Janus quinase 2-Sinal e Ativador de A via de transcrição 5) resulta na liberação de citocinas. Adaptado de Siemaszko *et al.*, 2021).

Além da citotoxicidade direta por meio da liberação de grânulos tóxicos (granzima e perforina), receptores de morte (FasL e TRAIL) e CD16 (ADCC), as células NK possuem papel relevante na regulação da imunidade inata e adaptativa (Zhang *et al.*, 2006a), por meio da secreção de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (Ferlazzo e Münz, 2004) (Figura 4). Uma vez ativadas, as células NK produzem citocinas, principalmente, Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as quais aumentam a sua citotoxicidade e recrutam monócitos/macrófagos, DCs, células T e células B, atuando como agentes promotores de apoptose em células tumorais/infectadas (Seeger *et al.*, 2014; Gross *et al.*, 2013).

IFN- $\gamma$  tem função imunomoduladora na resposta de célula T, promovendo, entre outras funções, a polarização TH1 e ativação de célula T CD8 + (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). Atua na ativação de macrófagos e promove o aumento da apresentação de antígenos por meio da regulação positiva de moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade - do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe I e classe II. Em conjunto, essas ações contribuem na imunidade contra tumores, antimicrobiana e antiviral (Schroder *et al.*, 2004) (Figura 4).

De forma semelhante às células Th1 e Th2 diferenciadas, *in vitro*, na presença de citocinas IL-12 e IL-4 (Kimura e Nakayama, 2005), subtipos de células NK humanas podem ter um perfil distinto de citocinas, baseado na produção, ou não, de IFN- $\gamma$  (Deniz *et al.*, 2002). As células NK com produção predominante de IFN- $\gamma$  (NK1, semelhantemente às Th1) quase não produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (Deniz *et al.*, 2002). Por outro lado, as células NK não

secretoras (ou alguma secreção) de  $\text{IFN-}\gamma$  (NK2, semelhantemente às Th2) produzem IL-4, IL-5 e, principalmente, IL-13 (Deniz *et al.*, 2002) (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismos básicos de ação das células NK.** As células NK podem ter ação na atividade citotóxica inata, bem como modular a imunidade inata e adaptativa. **A)** como células matadoras naturais, detectam níveis de expressão de ligantes induzidos por estresse (“*induced self*”) bem como níveis diminuídos, ou ausentes, da expressão de moléculas MHC de classe I (“*missing self*”), em células alvo, que podem ser reconhecidos por receptores ativadores ou inibitórios respectivamente, cujo equilíbrio determina a ativação dessas células; **B)** após a ativação, as células NK podem induzir a lise das células alvo por meio da secreção de grânulos citotóxicos, contendo, granzima B e perforina, a interação entre receptores de morte/ ligante e pela citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC); **C)** Por outro lado, células NK ativadas podem secretar uma variedade de citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento e a maturação e de células dendríticas (DC), que podem modular ainda mais a resposta de células T, incluindo a ativação, e/ou inibição, de células T CD8 + citotóxica e de células *Helper* (Th). Adaptada de Wang *et al.*, 2021.

As células NK induzem sinais que promovem a maturação de DCs com produção de citocinas, com aumento da função de células TCD4+ e diferenciação para células Th1 e modulam, positivamente, respostas efetoras de células T, principalmente pela produção de  $\text{IFN-}\gamma$ . Por outro lado, podem também regular negativamente a atividade efetora de outras células do sistema imune (Zhang *et al.*, 2006b).

Células NK têm a capacidade de “suprimir” processos inflamatórios contra diversos patógenos por meio da produção de IL-10 (Perona-Wright *et al.*, 2009). Em modelo experimental de leishmaniose visceral, células NKs secretoras de IL-10, presentes em granuloma de baço e fígado, foram capazes de inibir a proteção contra o parasita, e a

produção desta citocina esteve associada a um processo inflamatório crônico durante a infecção com *Leishmania donovani* (intravenosa) (Maroof *et al.*, 2008).

Em infecções induzidas por *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia pestis*, a citocina IL-12 secretada por DC induziu a produção de grandes quantidades de IL-10 por células NK que, por sua vez, inibiu a secreção de IL-12 por DC (Perona-Wright *et al.*, 2009). Ainda neste estudo, foi observado que a produção de IL-10 por células NK pode diminuir os processos inflamatórios. Também observaram que, quando os camundongos são desafiados com patógenos que não levam à infecção disseminada, como o vírus da gripe ou cepa atenuada de *Yersinia pestis* não disseminada, as células NK secretam IFN- $\gamma$ , mas não secretam IL-10. Esses resultados sugerem que a "força" do desafio microbiano é traduzida na secreção de IL-12, que por sua vez modula a resposta das células NK: estimuladora no caso do IFN- $\gamma$ , e inibitória, no caso de uma maior secreção de IL-10 (Vivier e Ugolini, 2009).

Em humanos, a produção de IL-10 por células NK foi detectada em pacientes com infecção por vírus C da hepatite (De Maria *et al.*, 2007), bem como, a produção de IL-10 por NK foi associada a um efeito supressor na proliferação de células TCD4+ antígeno específica (Deniz *et al.*, 2008). Neste último estudo, foi observado que apenas parte das células NK foram capazes de produzir IL-10, *ex vivo*, sugerindo haver um subgrupo secretor específico dessas células.

O subgrupo de células NK produtoras de IL-10 foi proposto serem células NK reguladoras (NKreg), com importante papel regulador, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo caracterizadas, fenotipicamente, como células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/+</sup> (Zhang *et al.*, 2006b). As células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (ou CD16<sup>low</sup>) são mais abundantes em tecidos linfóides secundários (gânglios linfáticos e tonsilas) e são caracterizadas pela baixa citotoxicidade. Quando estimuladas, estas células produzem altos níveis de citocinas exercendo, primariamente, uma função reguladora (Fauriat *et al.*, 2010). Em contraste, a população CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> é caracterizada pela baixa produção citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e alta capacidade citotóxica (Fauriat *et al.*, 2010).

As principais citocinas produzidas por células NKreg CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> são IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF (do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), IL-10 e IL-13, dependendo das condições de estímulo (celular ou citocinas) e do microambiente (Fauriat *et al.*, 2010; Poli *et al.*, 2009). O efeito imunorregulador das NKregs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> foi observado em algumas doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, com supressão da resposta T a autoantígenos e indução de apoptose de células T ativadas (Jiang *et al.*, 2011). Além disso, células NK do sangue periférico CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> produtoras de IL-10 estão aumentadas no início da gravidez comparadas aos números em mulheres com aborto espontâneo (Higuma-Myojo *et al.*, 2005). Também foi observado que parte das NKs da decídua também secretam IL-10

(Deniz *et al.*, 2008). Em conjunto, esses dados mostram a existência de células NK com atividade imunorreguladora.

No contexto imunossupressor da endometriose, as células NKreg poderiam participar da modulação negativa na apresentação antigênica de antígenos endometriais ectópicos e prejudicar a ativação de células TCD8+ citotóxicas, contribuindo para a fisiopatologia da doença. Diversos estudos indicam haver uma diminuição da atividade citotóxica de células NK em mulheres com EDT, quando comparada àquela de mulheres CTRs, sem a doença (Oosterlynck *et al.*, 1991; Oosterlynck *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992; Iwasaki *et al.*, 1993). Esta parece ser uma alteração imunológica relevante na EDT, uma vez que, além de macrófagos e neutrófilos que chegam à cavidade peritoneal, uma das principais células implicadas na eliminação do tecido endometrial ectópico é a célula NK (Oosterlynck *et al.*, 1991). IL-10 e TGF- $\beta$ 1 estimulam a proliferação e invasão de células endometriais estromais *in vitro*, bem como o crescimento de lesões ectópicas *in vivo* (Liu *et al.*, 2017). Além disso, IL-10 produzida por células Th17 pode cooperar com a citocina IL-17A, promovendo o crescimento, adesão, invasão e implantação de células endometriais estromais ectópicas, e reduzindo a apoptose *in vitro* e *in vivo* (Chang *et al.*, 2017).

A diminuição da atividade citotóxica de células NK na EDT é descrita como mais pronunciada nas fases moderadas e graves da doença (Oosterlynck *et al.*, 1991; Garzetti *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1994). O número absoluto e/ou a porcentagem de células NK em mulheres com EDT estão descritos de forma variável em alguns estudos, como diminuído em tecido uterino de modelo experimental da doença (Ota *et al.*, 2002), aumentado no fluido peritoneal de mulheres em estádios iniciais da EDT (Hill *et al.*, 1988) e aumentado no sangue periférico nos casos de doença profunda de retossigmóide (Dias *et al.*, 2012), quando comparados aos de mulheres CTRs sem a doença. Porém, os mecanismos pelos quais a atividade citotóxica está diminuída, ainda não estão bem compreendidos, podendo haver tanto alterações funcionais intrínsecas dessas células, como a presença de fatores solúveis implicados nessa disfunção.

Considerando que MICA é uma molécula induzida por células em condição de estresse biológico, ela pode ser expressa como antígenos próprios induzidos (“*induced self*”) (Figura 1) e reconhecida por células NK, via receptor de ativação, NKG2D. Após reconhecimento e ativação dessas células, são desencadeadas suas ações por meio de citotoxicidade e produção de citocinas, especialmente IFN- $\gamma$ . Tais ações, podem envolver regulação imunológica com atividades tanto pró, com produção da citocina inflamatória, IFN- $\gamma$ , como anti-inflamatórias, com produção de IL-10. Além disso, MICA na sua forma solúvel pode, de alguma forma, modular negativamente na atividade citotóxica dessas células NK.

#### 1.4 MICA - Major Histocompatibility Class I Chain-related A

As moléculas MICA são codificadas pelo gene *MICA*, localizado no cromossomo 6, na região de classe I do MHC, e são altamente polimórficas (Bahram, 2000). Diferentemente das moléculas HLA classe I clássicas (HLA-A, B e C), as moléculas codificadas pelo gene *MICA* não participam da apresentação de peptídeos e não estão associadas à cadeia  $\beta_2$ -microglobulina (Groh *et al.*, 1996).

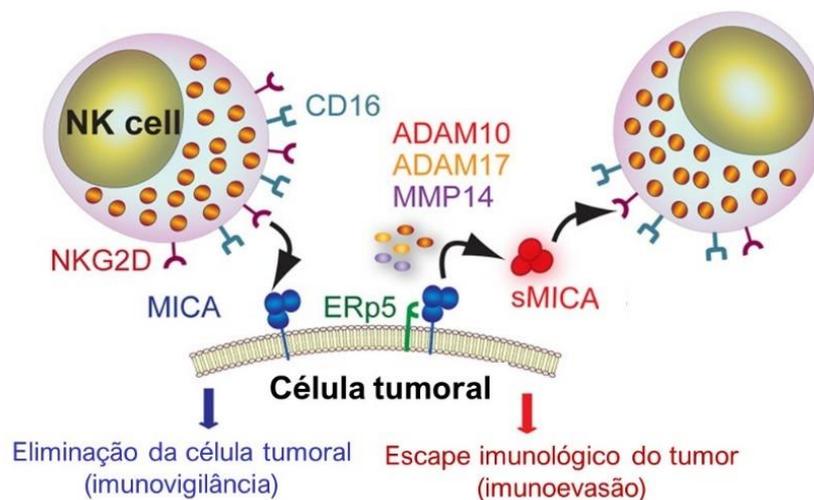
A molécula MICA é descrita como expressa, constitutivamente, em epitélio gastrointestinal, células endoteliais e fibroblastos (Zwirner *et al.*, 1999). No entanto, sua expressão também foi observada em células epiteliais de fígado, pâncreas, estômago, brônquios, bexiga, ureter, mama, amígdala e timo, localizada, predominantemente, intracelularmente (citoplasma) e com baixa expressão na membrana celular (Ghadially *et al.*, 2017).

MICA é uma molécula que pode ser induzida em diferentes tipos celulares em situação de estresse biológico, incluindo transformação maligna (Gasser *et al.*, 2005), infecção por patógenos (Lodoen e Lanier, 2006), bem como na presença de choque térmico (Groh *et al.*, 1996) e estresse oxidativo (Peraldi *et al.*, 2009). Com base nessas características, surgiu o conceito de MICA como uma molécula “*induced-self*” (próprio induzido), funcionando como um alerta ao sistema imune, em condições patológicas e de estresse (Carapito e Bahram, 2015) (Figura 5).

MICA tem como ligante, até o momento, o receptor de ativação de lise celular NKG2D, expresso em células NK, TCD8+ e  $T\gamma\delta$  (Pardoll, 2001), como acima citado. A interação MICA-NKG2D induz a lise de células alvo, por células NK, e pode ainda fornecer coestímulo para as respostas de células T CD8+ citotóxicas (Groh *et al.*, 2001). A falha na expressão de MICA, na situação de estresse celular, pode levar à falha no estímulo efetor de citotoxicidade, e consequente disseminação de infecção intracelular ou tumorigênese/metástase (Carapito e Bahram, 2015). Na condição de transformação maligna, MICA de membrana é sugerida como um “marcador” inicial de vigilância tumoral (revisado em Nausch e Cerwenka, 2008). Corroborando esta hipótese, um estudo recente de revisão sistemática e meta-análise mostrou haver associação entre a alta expressão de MICA de membrana (imunohistoquímica) e a boa evolução de câncer do aparelho digestivo (Zhao *et al.*, 2017).

A molécula MICA pode também ser encontrada na forma solúvel (sMICA). Os mecanismos propostos para a produção de MICA solúvel envolvem a clivagem proteolítica por metaloproteinases de matriz (MMPs) (Matusali *et al.*, 2013), principalmente, MMP2 (Yang *et al.*, 2014), MMP9 (Sun *et al.*, 2011) e MMP14 (Liu *et al.*, 2010) e por desintegrina e metaloproteinases (ADAMs, do inglês, *A Disintegrin And Metalloproteinase*) (Waldhauer *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) como, ADAM10 (Zingoni *et al.*, 2020) e ADAM17 (Waldhauer *et al.*, 2008). Além da ação de proteases, MICA também pode ser liberada em exossomas (Whiteside 2013) (Figura 5).

As MMPs estão amplamente implicadas na destruição da matriz extracelular, invasão da membrana basal e angiogênese (Reiss *et al.*, 2006). Muitas ADAMs são proteases presas à membrana sendo uma das suas principais funções, a clivagem proteolítica de ectodomínios de proteínas transmembranárias, incluindo citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular, da superfície celular (White 2003). Muitas ADAMs são frequentemente superexpressas em tumores e acredita-se que desempenhem papéis importantes em diferentes etapas da tumorigênese (White 2003). Destacamos que as MMP2 e MMP9, envolvidas na clivagem de MICA, também têm importante função na imunorregulação de células tronco mesenquimais (MSC, do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*) humanas derivadas de tecido adiposo, e envolvidas na atividade imunossupressora dessas células (Lavini-Ramos *et al.*, 2017), podendo também ter contribuição na imunossupressão, na EDT.



**Figura 5. Papel duplo de MICA como molécula alvo para imunovigilância por células NK e como mediadora do escape imunológico de tumor/células estressadas.** MICA expressa na superfície celular como, por exemplo, de células tumorais/estressadas pode ser reconhecida pelas células NK, pelo receptor NKG2D, promovendo uma resposta citotóxica que leva à eliminação dessas células (imunovigilância). No entanto, MICA pode se associar com a chaperona ERp5 e, por meio de uma clivagem proteolítica mediada por ADAM10, ADAM17 e MMP14, gerar sMICA, promovendo uma regulação negativa de NKG2D e comprometimento das funções efetoras das células NK, facilitando assim o escape imunológico do tumor/células estressadas (imunoevasão). Adaptado de Fuertes *et al.*, 2021

MICA solúvel interage com seu receptor NKG2D, promovendo a endocitose e degradação do complexo MICA-NKG2D, comprometendo assim, a atividade citolítica de células NK e T citotóxicas (Boukouaci *et al.*, 2013; Groh *et al.*, 2002). Esse mecanismo de ação parece estar envolvido em diversos tumores, como carcinoma hepático (Luo *et al.*, 2020), mieloma múltiplo (Zingoni *et al.*, 2018) e câncer cervical (Arreygue-Garcia *et al.*, 2008) contribuído para a evasão tumoral. Além disso, essa interação pode resultar na expansão de células imunossupressoras TCD4+ NKG2D+, também colaborando para evasão imune do tumor (Groh *et al.*, 2006).

A ligação de MICA de membrana ao receptor de ativação, NKG2D, está diretamente relacionada com a variação dos domínios externos da molécula e à afinidade de interação, que pode variar também com polimorfismos genéticos (Isernhagen *et al.*, 2016). Algumas variantes gênicas de *MICA* codificam proteínas com diferentes afinidades de ligação com seu receptor, afetando o limiar de ativação de células NK e a modulação de células T (Isernhagen *et al.*, 2016). A afinidade diferencial está associada a uma substituição entre os aminoácidos metionina (Met) ou valina (Val), no resíduo 129 da molécula (Steinle *et al.*, 2001). A variante MICA-129Met fornece uma sinalização NKG2D mais forte, levando ao aumento da degranulação e produção IFN- $\gamma$  por células NK, em relação à variante MICA-129Val. No entanto, essa ligação mais forte também é capaz de desencadear mais rapidamente a regulação negativa de NKG2D da superfície da célula NK (internalização/degradação) e, portanto, diminuir ainda mais a atividade citotóxica desse receptor, via MICA (Isernhagen *et al.*, 2015). No entanto, a avaliação funcional desse dimorfismo na patogênese de doenças requer uma avaliação cuidadosa.

Outro polimorfismo funcional do gene *MICA* envolve a inserção de nucleotídeos logo antes da região transmembranária da molécula (grupo de alelos MICA5.1), ocasionando uma alteração no quadro de leitura de bases (*frameshit*) e a inserção de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ashiru *et al.*, 2013). Essa âncora é responsável pelo recrutamento dessas variantes da proteína MICA para microdomínios de membrana resistentes a detergentes (*lipid-rafts*) e, portanto, para vesículas extracelulares (exossomas) (Ashiru *et al.*, 2013). Esses alelos, cujas moléculas codificadas são ancoradas por GPI, são frequentemente referidos como o grupo de alelos MICA5.1, sendo muito frequentes em várias populações humanas no mundo todo (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2006), sendo o alelo MICA\*008 mais frequente em várias populações, inclusive na brasileira, como relatado por nosso grupo (Marin *et al.*, 2004). É importante destacar que, assim como MICA solúvel derivada da ação de metaloproteinases clivadas da membrana celular, MICA presente em exossomas, também pode diminuir a expressão de NKG2D (Clayton *et al.*, 2008), colaborando para a evasão imune de células tumorais e/ou infectadas.

Níveis elevados de sMICA são encontrados em diversos tipos de cânceres, principalmente em estádios mais avançados da doença, sugerindo participar dos mecanismos de imunossupressão no câncer. Nesse sentido, níveis elevados de sMICA têm sido associados a um pior prognóstico (Salih *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2012), sendo considerado um potencial marcador prognóstico em vários tipos de cânceres, segundo estudo de revisão sistemática e meta-análise (Zhao *et al.*, 2017).

Embora a EDT seja, em geral, considerada uma doença benigna, devido à sua estrutura histológica preservada (Cannistra, 2004), ela compartilha características fisiopatológicas com o câncer, como ocorrência de invasão celular e crescimento desordenado, além de neovascularização e uma diminuição no número de células em apoptose (Swiersz, 2002). Como nas doenças malignas, os implantes endometrióticos podem

disseminar-se para a cavidade abdominal e, também para locais mais distantes. As células endometriais ectópicas se ligam, invadem e penetram nos tecidos e, muitas vezes, se manifestam como lesões profundas infiltrantes. Porém, ao contrário das lesões malignas, a EDT não resulta em um estado proliferativo ou catabólico incessante e, raramente é fatal (Swiersz, 2002). Não obstante, alguns estudos encontraram associações significativas entre a prevalência de EDT e câncer de ovário (revisado em Heidemann *et al.*, 2014). As citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6, presentes em níveis maiores no fluido peritoneal nas mulheres com EDT (Eisermann *et al.*, 1988; Harada *et al.*, 1997), também são elevadas em sobrenadante de cultura de epitélio de câncer ovariano, quando comparados àqueles das CTRs saudáveis (Szlosarek *et al.*, 2006).

A visão dominante na comunidade científica é considerar EDT como uma doença inflamatória crônica. Considerando que MICA é uma molécula induzida em diversos tipos celulares em condição de estresse, levantamos a hipótese de que o ambiente inflamatório peritoneal poderia contribuir para o estresse local favorecendo, inicialmente, o aumento da expressão de MICA na superfície de células endometrióticas (estádios iniciais da doença), ou mesmo no endométrio eutópico alterado nessas mulheres (Brosens *et al.*, 2012), funcionando como um “sinal de alerta biológico”. Com a evolução da doença (estádios III e IV) e, por ação de metaloproteinases, poderia haver liberação de MICA da forma solúvel em níveis elevados. Nesse sentido, é sabido que lesões endometrióticas podem produzir TGF- $\beta$  (Cruz e Reis 2015), citocina esta que também estimula a expressão de MICA na superfície celular e sua posterior liberação na forma solúvel (Klöß *et al.*, 2015). MICA solúvel, por sua vez, pode modular negativamente a expressão de seu receptor, NKG2D, em células NK e T $\alpha$  $\beta$ CD8+, reduzindo a resposta citotóxica destas células.

Corroborando esta hipótese, alguns trabalhos sugerem que fatores solúveis presentes no soro ou no fluido peritoneal (microambiente das lesões) interagem com as células NK, inibindo a resposta efetora contra as células endometriais ectópicas. Em concordância com esta hipótese, o tratamento de células NK com soro de mulheres com endometriose (Kanzaki *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992), bem como com fluído peritoneal e folicular (Oosterlynck *et al.*, 1993), mostrou uma diminuição da atividade citotóxica quando comparado ao tratamento com mulheres sem EDT. De maneira semelhante, fatores solúveis, também presentes no sobrenadante de cultura de células estromais de endométrio de mulheres com endometriose, foram capazes de suprimir a atividade citotóxica de células NK (Somigliana *et al.*, 1996). Ainda concordante com essa hipótese, foram observados níveis mais elevados de sMICA no fluido peritoneal de mulheres com EDT, em relação aos encontrados em mulheres CTRs, sem a doença (incluindo outras doenças benignas) (González-Foruria *et al.*, 2015).

Defeitos na habilidade de células NK e T citotóxicas em reconhecer e eliminar o endométrio extrauterino têm sido considerados cruciais na patogênese da endometriose e MICA poderia ter um papel na imunopatologia dessa doença

Considerando que a deficiência funcional de células NK citotóxicas tem sido implicada na fisiopatologia da endometriose, e que a molécula MICA tem sua expressão celular induzida por estresse biológico, levantamos a hipótese do potencial papel de MICA na imunopatologia da endometriose. Ademais, uma vez que sua forma solúvel (sMICA) modula negativamente a expressão de seu receptor, NKG2D, em células NK, sMICA pode ter envolvimento na diminuição da atividade funcional de células NK nessa doença, contribuindo de forma relevante na eliminação ineficiente de tecido endometrial ectópico e para o estabelecimento/desenvolvimento da doença. Consideramos também que a proteína MICA, na sua forma solúvel, tem potencial implicação na evolução/gravidade da doença, podendo ser modulada positivamente pelos hormônios sexuais envolvidos nas diferentes fases do ciclo menstrual.

---

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Testar a hipótese do envolvimento de MICA na imunopatologia da endometriose, inclusive contribuindo para a deficiência da atividade efetora de células NK.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **Determinar se na endometriose:**

1) há perfil diferencial dos níveis de sMICA, da expressão proteica de MICA, da frequência e de subpopulações de células NK circulantes:

- em relação às diferentes fases do ciclo menstrual e potenciais efeitos hormonais
- em relação à gravidade da doença e/ou em relação a tipos morfológicos da doença

2) há alteração da expressão gênica diferencial de MICA no endométrio eutópico, sugerindo a existência de algum desequilíbrio imunobiológico prévio ao deslocamento de tecido endometrial.

## **MÉTODOS**

---

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Participantes da pesquisa

As participantes da pesquisa incluídas no estudo foram mulheres diagnosticadas com endometriose (grupo endometriose, EDT, n=173) e mulheres sem endometriose (grupo controle, CTR, n=86), submetidas à cirurgia laparoscópica e análise histopatológica, garantindo, portanto, a confirmação do diagnóstico da doença ou da ausência da mesma nos respectivos grupos. O grupo CTR foi constituído por mulheres saudáveis submetidas à laqueadura tubária (LAQ, n=60) ou ao tratamento cirúrgico de outras doenças ginecológicas não inflamatórias (DNI, n=26).

Salientamos que, sempre que possível, as mesmas pacientes (grupos EDT e CTR) foram incluídas em todas as abordagens de análise deste estudo.

Todas as mulheres incluídas neste estudo foram provenientes do Serviço de Endometriose do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP (grupo EDT) ou do Setor de Planejamento Familiar do HCFMUSP (grupo CTR). Foi concedida autorização prévia, com assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Anexos I-A e -B), para utilização de informações clínicas, bem como para a coleta do material biológico. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, N° 0505/07 e 0386/11) do HCFMUSP (Anexo II, -A, -B e -C).

#### 3.2 Casuística

O número amostral, para cada abordagem experimental do estudo, foi definido com base em cálculo amostral prévio, levando-se em conta a variabilidade dos dados (estimativa de desvio padrão dentro de cada grupo, em estudos já realizados), a diferença esperada entre os grupos, o nível de significância e o poder do teste. Foi estabelecido um nível de significância de 5% e um poder do teste de 80%.

Para a variável contínua “concentração de MICA solúvel (pg/mL) buscamos encontrar uma diferença entre caso e controle de 0,4, com uma variação igual a 1 (n=100). Na ausência de dados na literatura científica específicos para expressão gênica e proteica de MICA em endometriose, foram utilizados estudos de MICA em câncer. Para as variáveis expressão gênica-mRNA e expressão proteica, o “n” amostral estimado foi de 23, buscando-se encontrar uma diferença entre caso e controle de 30, com uma variação estimada de 35 (Basu *et al.*, 2008; Textor *et al.*, 2008). Para a variável “análise funcional de células NK” (medida em porcentagem), buscamos encontrar uma diferença entre caso e controle de 10, com uma variação igual a 10,5, com “n” amostral de 19 (González-Foruria *et al.*, 2015; Oosterlynck *et al.*,

1992). Programa estatístico utilizado: *Power Analysis Sample Size (PASS)*. Salientamos que este foi o número estimado, mas o número real de sujeitos de pesquisa atingido, para alguns estudos, foi maior, conforme apresentado adiante, no Desenho do Estudo (item 3.5, Figura 6).

### **3.3 Dados clínicos e critérios de seleção**

Em relação aos dados clínicos das pacientes, as informações referentes aos tipos de endometriose foram obtidas a partir dos registros nos relatórios cirúrgicos, feitos em formulário específico (Anexo III). A avaliação do estágio da doença foi baseada no critério de classificação da rASRM, 1996 (Canis *et al.*, 1997) (Anexo IV). Sempre que possível, biópsias de endométrio coletadas durante as cirurgias tiveram a datação determinada por análise anatomopatológica (Anatomia Patológica do HCFMUSP), com o objetivo de determinar a fase do ciclo menstrual em que se encontrava a mulher, na data da laparoscopia. Na ausência da datação histológica, a fase do ciclo foi determinada contando-se os dias a partir do primeiro dia da data do último período menstrual, informada pela paciente.

De acordo com o local de acometimento da doença, a endometriose foi classificada como endometriose peritoneal, endometriose ovariana ou endometriose profunda infiltrativa (Nisolle e Donnez, 1997). Os grupos foram caracterizados como: SUP: lesões na superfície do peritônio; OVA: endometriose ovariana, com ou sem doença peritoneal e sem endometriose profunda; PROF: endometriose profunda com ou sem endometriose peritoneal e sem endometriose ovariana; PROF + OVA: profunda na presença de OVA.

Os critérios adotados para a seleção das participantes da pesquisa foram os abaixo descritos.

#### **Critérios de inclusão:**

- Mulheres dos grupos endometriose e controle, submetidas à cirurgia laparoscópica
- Endometriose comprovada histologicamente, no caso do grupo EDT
- mulheres em idade fértil, com períodos menstruais eumenorréicos, com intervalo entre os ciclos variando de 26-45 dias.

#### **Critérios de exclusão**

- Presença de sinais clínicos de doença autoimune e/ou câncer;
- Doença inflamatória no caso do grupo CTR
- Presença de sinais clínicos ou laboratoriais de infecção ginecológica;
- Uso de terapia hormonal (análogos do GnRH mensais, progestágenos e contraceptivos hormonais) nos últimos 3 meses antecedentes à coleta da amostra, ou por seis meses com o uso de análogos do GnRH de ação trimestral.

### 3.4 Material biológico

Parte das amostras utilizadas neste estudo foram provenientes do “Banco de Tecidos e Fluidos Corporais de Pacientes com Endometriose” cuja coleta de amostras teve aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, nº0505/07; Anexo II-A) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Outra parte foi obtida de coleta prospectiva, integrante do Projeto Temático FAPESP2010/10338-0, “Endometriose: bases moleculares da resposta imunológica”, também previamente aprovado pela comissão de Ética do HCFMUSP (CAPPesq nº 0386/11; Anexo II-B e -C), o qual incluiu parte do presente estudo. A coleta e armazenamento das amostras seguiu o protocolo proposto pela *The World Endometriosis Research Foundation (WERF) Endometriosis Phenome e Biobanking Harmonisation Project (EPHect)* (Becker *et al.*, 2014; Rahmioglu *et al.*, 2014).

- *Sangue periférico:*

Soro: Obtido de, aproximadamente, 5 mL de amostra de sangue coletado sem anticoagulante, antes da indução anestésica. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1300g, por 10 minutos (min), para obtenção do soro. As alíquotas de soro foram armazenadas a -80 °C, até o momento do uso.

Utilização: pesquisa de MICA solúvel.

Sangue heparinizado: (10-20mL) utilizado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). As amostras de PBMC foram, posteriormente, criopreservadas (nitrogênio líquido) até o momento do uso.

Utilização: análise da atividade efetora de células NK.

- *Fluido peritoneal (FP):* coletado no início da laparoscopia, logo após as punções com os trocáteres, por meio de aspiração em seringa estéril (em média de 1 a 5mL). As amostras foram centrifugadas a 1300g, por 10min, para separação da fração celular. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos de congelamento estéreis, em freezer a - 80°C, até o momento do uso.

Utilização: pesquisa de MICA solúvel.

- *Tecidos:*

endométrio eutópico - de mulheres dos grupos EDT e CTR

endométrio ectópico - lesão de endometriose profunda (grupo EDT).

A coleta de biópsia de endométrio eutópico foi realizada por aspiração, utilizando-se *Pipelle de Cornier* (Laboratoire CCD, Paris, França), no início da cirurgia. Parte da lesão (EDT)

e do endométrio eutópico (EDT e CTR) foi encaminhada à divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP para análise histopatológica de rotina. Outra parte dos tecidos (lesão de endometriose profunda e endométrio eutópico) foi armazenada em criotubo e, imediatamente, congelada em nitrogênio líquido e, posteriormente, transferida para freezer -80 °C, onde permaneceu até o momento de uso. As amostras das lesões de endometriose profunda foram constituídas de lesão de endometriose intestinal de reto-sigmóide ou de lesão de endometriose retrocervical.

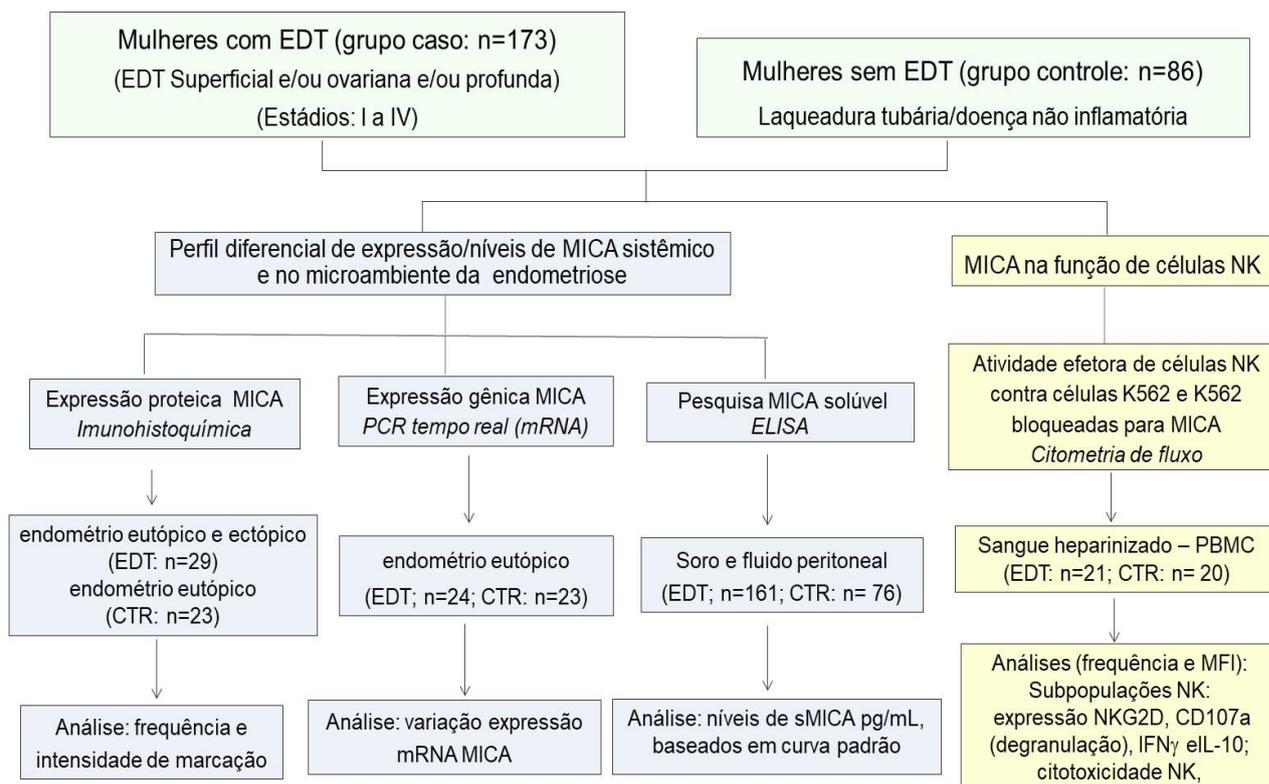
Utilização:

- endométrio eutópico: análise da expressão gênica e proteica de MICA.
- lesão de endometriose profunda: análise da expressão proteica de MICA.

### **3.5 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo analítico, observacional e transversal. As mulheres do grupo EDT foram avaliadas clinicamente, pela história, exame físico e de imagem (ultrassonografia pélvica e/ou transvaginal e, por ressonância magnética, quando indicada) de acordo com a indicação clínica, para confirmação da EDT e posterior indicação cirúrgica. Uma vez selecionadas, as mulheres foram submetidas à laparoscopia, seguindo a rotina habitual do serviço de Endometriose, do HC-FMUSP. As mulheres do grupo CTR foram avaliadas, no ato operatório, quanto à presença macroscópica de EDT e, em caso de suspeita, foi realizada a coleta do tecido para exame histopatológico. Em caso positivo para a doença, a paciente foi excluída do grupo CTR.

Na Figura 6 apresentamos o desenho do estudo, incluindo as variáveis teóricas e operacionais relacionadas a cada abordagem experimental do mesmo.



**Figura 6. Desenho do estudo.** **Variáveis teóricas:** avaliação de perfil diferencial de expressão gênica e proteica de MICA e dos níveis de MICA solúvel (sMICA), sistemicamente (soro) e no microambiente da lesão (fluido peritoneal), entre mulheres com EDT e controles saudáveis, e avaliação do potencial envolvimento de MICA na função de células NK, na EDT. **Variáveis operacionais:** expressão proteica de MICA por imunohistoquímica; expressão gênica de MICA por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), pesquisa de MICA solúvel por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e avaliação da atividade efetora de células NK por meio da avaliação de células NK que expressam CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 e da citotoxicidade contra células K562; EDT: grupo endometriose, CTR: grupo controle, PBMC: células mononucleares do sangue periférico; mRNA: ácido ribonucleico mensageiro; K562: linhagem de células de leucemia mielóide crônica humana.

### 3.6 PCR quantitativa em tempo real: expressão gênica de *MICA*

A análise da expressão de mRNA para o gene *MICA* foi realizada por qRT-PCR (reação de polimerização em cadeia quantitativa em tempo real) após a extração do RNA total de tecido de endométrio eutópico (grupo EDT e grupo CTR) e preparo da síntese de DNA complementar (cDNA). Foi também realizada a seleção dos *primers* (iniciadores) específicos para o gene *MICA* e *primers* endógenos, utilizados para o controle da expressão.

#### 3.6.1 Extração de RNA total

As amostras de tecido endometrial (aproximadamente 100mg) foram descongeladas em gelo, ressuspensas em 1mL de *Trizol*® (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (*Invitrogen*, Waltham, EUA) e transferidas para tubos de 2mL (livres de

RNase/DNase), contendo esferas metálicas (*Omni International Inc.*, Kennesaw, Georgia, EUA) (em gelo). Em seguida, os tubos foram transferidos para o homogeneizador de tecidos *Precellys®* (*Bertin Technologies*, Montigny-le-Bretonneux, França). Neste equipamento, foram realizados 3 ciclos de centrifugação/homogeneização a 4700g, por 15 segundos (seg), com pausa de 20seg a cada ciclo, com temperatura ( $T^{\circ}$ ) mantida entre 2-8°C, para obtenção de um homogenato tecidual.

A partir do homogenato de tecido em solução de *Trizol®*, deu-se prosseguimento à extração de RNA, segundo o protocolo do fabricante. Foram adicionados ao tubo 200µl de clorofórmio, seguindo-se com agitação vigorosa (15seg) e incubação por 3min, em TA. Após centrifugação por 12.000g, 15min, a 4°C, houve separação em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa, a qual contém o RNA, foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µl de álcool isopropílico, seguindo-se de inversão do tubo para precipitação do RNA. Após incubação por 10min, TA, os tubos foram centrifugados a 12.000g, por 10min, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500µl de etanol 75%, seguindo-se com centrifugação a 7500g, por 5min, a 4°C.

O sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e o tubo foi mantido aberto, por 5 min, TA, para secagem do RNA, favorecendo, assim, a evaporação dos resíduos de etanol. Em seguida, o RNA foi ressuspensão em 10-30µl de água livre de RNase (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA). A concentração de RNA total (ng/µl) foi verificada utilizando-se o espectrofotômetro *NanoDrop®ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), em comprimento de onda ( $\lambda$ ) 260nm. Além da concentração, foram avaliadas a razão das absorbâncias  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ nm, indicativa do grau de contaminação por proteínas (ideal= 1,8-2,0), e a razão  $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ nm para avaliação de possíveis contaminantes químicos (ideal= 2,0-2,2). Em seguida, os tubos contendo RNA foram mantidos a -80°C.

### 3.6.2 Tratamento com DNase e análise da qualidade do RNA total

Para evitar a presença de DNA contaminante, o RNA extraído foi submetido a tratamento com DNase (deoxirribonuclease; *Thermo Fisher Scientific*, EUA), conforme recomendação do fabricante. Foram adicionadas 2U de DNase-I (1U/µl), 20U de RNaseOUT™ (inibidor de ribonuclease recombinante, 40U/µl) (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), 2µl de solução tampão 5X Buffer 1<sup>st</sup> Strand (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), e água DEPC (Dietilpirocarbonato), (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) quantidade suficiente para (q.s.p.) 10µl, seguindo-se de incubações a 37°C, por 10min, e a 75°C, por 5min.

A integridade e pureza do RNA total foram avaliadas utilizando-se o equipamento 2100 *Bioanalyser* (*Agilent Technologies*, EUA). Esta análise baseia-se no princípio de separação eletroforética em matriz de gel aplicado nos capilares de um *chip* que contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos aos marcadores e ao

RNA resulta em fluorescência que é então quantificada, permitindo a separação dos RNAs ribossômicos 18S e 28S e a atribuição de um número de integridade (RIN, do inglês, *RNA Integrity Number*). O valor de RIN é gerado, automaticamente, pelo programa do equipamento, variando de 1-10. RNAs com valores de RIN  $\geq 5$  são considerados adequados para a técnica de qRT-PCR (Fleige e Pfaffl 2006). Após as avaliações de qualidade das amostras de RNA total, as mesmas foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da sua utilização para a síntese de cDNA. No Anexo V, Figura 1 está um exemplo da representação gráfica da integridade de uma amostra de RNA gerada pelo programa, bem como os valores de RIN determinados para cada amostra (Anexo V, Tabela 1).

### 3.6.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada a partir de  $1\mu\text{g}$  de RNA total, ao qual foram adicionados:  $1\mu\text{l}$  de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP, a  $10\text{mM}$ ) (*Invitrogen*, EUA),  $1\mu\text{l}$  de *primer* Oligo<sub>dT</sub>18 ( $500\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (*Invitrogen*, EUA) e  $1\mu\text{l}$  de água livre de DNase/RNase (volume final =  $13\mu\text{l}$ ), seguindo-se de incubação a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10min, e posterior manutenção em gelo. Em seguida, foram adicionados:  $4\mu\text{l}$  do tampão da enzima *SuperScript® III* (Buffer 5x; *Invitrogen*, EUA),  $1\mu\text{l}$  de Ditioneitol ( $0,1\text{M}$ ) (*Invitrogen*, EUA),  $0,5\mu\text{l}$  de RNaseOUT™ a  $40\text{U}/\mu\text{l}$  (*Invitrogen*, EUA),  $1\mu\text{l}$  da enzima transcriptase reversa *SuperScript® III*, a  $200\text{U}/\mu\text{l}$  (*Invitrogen*, EUA) e  $0,5\mu\text{l}$  água livre de RNase/DNase ( $20\mu\text{l}$  de solução por tubo).

A reação de síntese de cDNA ocorreu em 3 ciclos de incubação:  $25^{\circ}\text{C}$  por 10min,  $55^{\circ}\text{C}$  por 2h e  $75^{\circ}\text{C}$  por 15min, em termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, EUA). Por fim, foi adicionado  $1\mu\text{l}$  de RNaseH (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, EUA) a cada reação, com posterior incubações a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30min, e a  $72^{\circ}\text{C}$ , por 10min. As amostras de cDNA foram então diluídas na proporção 1:3, em água livre de DNase/RNase e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso para as reações de qRT-PCR.

### 3.6.4 Seleção dos primers

A análise de expressão do gene MICA foi realizada por qRT-PCR utilizando-se *primers* (iniciadores) específicos para o gene *MICA* (Martín-Pagola *et al.*, 2003), que amplificam parte da região gênica que codifica para os domínios extracelulares  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  da molécula MICA, respectivamente. Como gene normalizador da expressão do gene *MICA*, foi utilizado o gene endógeno,  $\beta$ -actina. O desenho do *primer* para  $\beta$ -actina foi realizado com o auxílio do programa *Primer Express® Programa v.2.0* (*Applied Biosystems*, EUA). A sequência dos *primers* de  $\beta$ -actina foi extraída do banco de dados genômicos *NCBI Reference Sequence*,

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>; acesso NG\_007992.1). Os *primers* selecionados respeitaram as características de 18-25 bases, T° de anelamento entre 57-61°C e conteúdo de bases CG de 40-60%. No Anexo V, Tabela 2 estão apresentadas as sequências e características físico-químicas dos pares de *primers* utilizados.

Após a padronização, a concentração ideal dos *primers*, tanto para o gene *MICA* como para o gene controle, *β-actina*, foi definida como 100mM, considerando-se a menor concentração onde o Ct, e o perfil da curva de amplificação, apresentaram as menores variações em relação às maiores concentrações e com uma menor formação de dímeros de *primers*. Foram também verificadas as eficiências de amplificação (Ef) desses *primers*, bem como foi selecionada a concentração ideal de cDNA a ser utilizada na qRT-PCR. Para o cálculo da Ef do produto, foi utilizada a fórmula  $Ef = 10^{-1/\Delta C_t}$  ou  $Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$  (exemplos de curvas de amplificação e cálculos das eficiências dos *primers* estão apresentadas no Anexo V, Figura 2). O resultado das Efs foram de 1,86 (86%) para o *primer* *MICA* e 1,91 (91%) para o *primer* *β-actina*. A diluição de cDNA considerada adequada para a reação foi de 1:30. Valores de eficiência entre 1,8-2,2 indicam reprodutibilidade e exatidão na cinética de amplificação (Pfaffl, 2001).

### 3.6.5 Reações de qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, em placas para leitura óptica de 96 poços (*Applied Biosystems*, EUA) utilizando-se o equipamento *Perkin-Elmer ABI Prism 7500 sequence detection system* (*Applied Biosystems*, EUA), seladas com selo adesivo óptico (*Applied Biosystems*, EUA). O reagente *Fast SYBR® Green Master Mix* (*Applied Biosystems*, EUA), possui dNTPs, enzima DNA polimerase, solução tampão, além dos fluoróforos *ROX™* e *SYBR® Green* (*SYBR® Green Master Mix*, *Applied Biosystems*, EUA). A cada poço de reação foram adicionados 6μL do reagente *Fast SYBR® Green Master Mix*, 3μL da solução de *primers* (*forward* e *reverse*) e 3 μL da amostra de cDNA diluída 1:30. A reação de amplificação ocorreu em 40 ciclos de 15seg a 94°C, seguida de 1min a 60°C.

A intensidade de fluorescência na reação foi determinada pelo cálculo do  $\Delta R_n$  ( $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$ ), onde  $R_n^+$  representa a intensidade de emissão do *SYBR Green* / intensidade de emissão do *ROX*, em um dado momento da reação;  $R_n^-$  representa a intensidade de emissão do *SYBR Green* / intensidade de emissão do *ROX*, antes da amplificação. O fluoróforo *ROX* funciona como controle interno passivo na reação (emissão de fluorescência de intensidade constante durante toda a reação). Durante os ciclos iniciais da reação não há produto de amplificação, e os valores de  $\Delta R_n$  permanecem na linha de base (fluorescência do *ROX* > *SYBR Green*). Durante a fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação, levando o  $\Delta R_n$  a ultrapassar a linha de base. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de  $\Delta R_n$ , correspondente à linha de corte (*Threshold*), ponto da curva

onde se inicia a amplificação exponencial promovida por cada par de *primers*. O ciclo em que a  $\Delta Rn$  cruza o ponto de corte corresponde ao “ciclo de corte” ou *Threshold Cycle* (Ct) da amostra, é relativo à quantidade de mRNA alvo presente na amostra.

As amostras de endométrios eutópicos (CTR e EDT) foram amplificadas para os genes *MICA* e  $\beta$ -actina. A expressão do gene *MICA* foi avaliada em relação ao gene endógeno, para uma mesma amostra. Foi baseada no cálculo do  $\Delta Ct$ , onde os valores de  $\Delta Ct$  representam a diferença de expressão entre o gene alvo (Ct *MICA*) e o gene endógeno (Ct  $\beta$ -actina). Para tanto, foi utilizada a fórmula  $\Delta Ct = Ct_{MICA} - Ct_{\beta-actina}$ , onde Ct representa o valor médio de Ct da triplicata de amostra. Desta forma, quanto menor o valor de  $\Delta Ct$ , maior será a quantidade de mRNA do gene alvo presente na amostra. Neste estudo, optamos, em alguns resultados, por representar o valor do  $\Delta Ct$  por  $1/\Delta Ct$ , de forma a facilitar a apresentação gráfica e a interpretação dos resultados de expressão gênica.

### 3.7 Imunohistoquímica: expressão proteica de MICA

A pesquisa da proteína MICA em tecidos foi realizada pela técnica de imunohistoquímica, utilizando-se método imunoenzimático indireto. A identificação de antígeno foi baseada no método do complexo biotina-avidina-peroxidase, com revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), associado a peróxido de hidrogênio.

Nas mulheres do grupo EDT (n=29) foram analisadas biópsias de lesão de EDT profunda (endométrio ectópico: lesão de retossigmóide ou retrocervical) e do respectivo endométrio eutópico. Nas mulheres do grupo CTR (n=23), foram analisadas as biópsias do endométrio eutópico.

Os tecidos das biópsias acima descritos, já previamente fixados em formalina e incluídos em parafina para análise histopatológica na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP, foram cortados em micrótomo (aproximadamente 3 $\mu$ m) e montados em lâminas de vidro silanizadas (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri, EUA). Foram também preparados cortes histológicos adicionais para a realização da padronização da titulação dos anticorpos (Acs). Como controle positivo da expressão proteica de MICA, foram utilizados cortes de tecido de câncer cervical (epitelial). Os cortes e montagens das lâminas para a imunohistoquímica deste estudo foram realizados pelo Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica, Departamento de Patologia da FMUSP.

Inicialmente, as lâminas foram desparafinadas em xilol, a quente (estufa a 60-65°C, por 5min) e, posteriormente, submetidas a 3 banhos de xilol a frio. Seguiu-se de 2 etapas para hidratação, com banhos em etanol 95% e 70%, com lavagens em água corrente e água deionizada a cada banho, seguindo-se de banho em ácido fórmico puro (3min) e novas lavagens em água corrente e água deionizada, e finalizada em tampão PBS1x.

A recuperação antigênica foi obtida por alta T°, 125°, por 1min, em panela de pressão (*S2800-Dakocytomation*, Bensalem, Pensilvania, EUA) utilizando-se tampão citrato 10mM, pH6. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3%, por 5min, por quatro vezes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e em solução tampão fosfato-salina PBS/Tween® (solução detergente tamponante). Após essas etapas, foi adicionado, sobre cada corte de tecido, o Ac primário anti-MICA biotilado (*goat IgG Human MICA Biotinylated Antibody*, BAF1300, R&D Systems, Mineápolis, Minesota, EUA), 1:100, previamente titulado, com posterior incubação ON, em câmara úmida (4-8°C). As lâminas foram então lavadas por 3 vezes, em solução tampão fosfato-salina PBS 1x, por 3min cada lavagem. Em seguida, foi adicionado o Ac secundário IgG-HRP (*anti-goat IgG -HRP*, do inglês *horseradish peroxidase*) (1:100) e as lâminas foram incubadas, por 30min a 37°C, seguindo-se de mais 3 lavagens com PBS (por 3min). Em seguida as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio associado ao cromógeno DAB (diaminobenzidina).

Após cerca de 5min, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 10min, e contracordadas com Hematoxilina de *Harris*, seguido de nova lavagem em água corrente, por 5min e desidratadas em seguidos banhos de etanol (1min em cada): etanol 70%, etanol 95% e 3 banhos de etanol 100%. As lâminas foram então diafanizadas em 3 banhos de xilol (1min cada) e adicionadas as lamínulas sobre os cortes (com resina sintética), para posterior análise microscópica. Uma vez havendo a presença do antígeno MICA, o complexo resultante (biotina-HRP) reage com o peróxido de hidrogênio/DAB, emitindo uma coloração amarronzada.

Como teste para controle negativo de expressão, o Ac primário foi substituído por solução salina tamponada (PBS). As lâminas de controle positivo foram processadas de maneira semelhante às lâminas de amostras em teste.

### 3.7.1 Avaliação da expressão proteica de MICA

A expressão proteica de MICA foi avaliada baseando-se em escores, de acordo com a intensidade de marcação (0=sem marcação; 1=fraca; 2=moderada; 3=forte) e a porcentagem de células positivas (0= negativo; 1=1–25%; 2=26–50%; 3=51–75%; 4=76–100%). Esta análise foi realizada tanto para pesquisa da proteína MICA na glândula (epitélio) como no estroma, no mesmo tecido. O produto obtido pela multiplicação entre o escore de intensidade e o escore da porcentagem de células positivas (que variou entre 0 e 12) definiu o escore de imunorreatividade (EIR). Portanto, obtivemos um EIR para glândula e outro para estroma. Posteriormente, o EIR do epitélio glandular foi também categorizado como expressão alta ou baixa, baseando-se no valor da mediana de expressão do EIR do epitélio glandular no endométrio eutópico do grupo CTR (baixa, ≤ mediana; alta, > mediana). A avaliação microscópica (leitura) das lâminas de imunohistoquímica foi realizada por um médico patologista.

### 3.8 ELISA para pesquisa de MICA solúvel

A pesquisa de MICA solúvel (sMICA) foi realizada pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando-se o kit comercial “*Kit Duo Set Human MICA*” (*R&D Systems*, EUA), segundo o protocolo do fabricante. A pesquisa de sMICA foi realizada em soro e fluido peritoneal (FP), pareados, de mulheres com e sem EDT (grupo CTR). Como parâmetro de detecção, foi utilizada uma curva padrão para a proteína MICA (*Human MICA Standard*) nas concentrações 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25pg/mL, como sugerido pelo fabricante do *kit*, sendo o limite de detecção do teste considerado 31,25pg/mL. Todos os testes (curva padrão e amostras teste) foram realizados em duplicata.

Para o teste, foram utilizadas microplacas de alta ligação com 96 poços e fundo chato (*Nunc MaxiSorp*, Roschester, New York, EUA), que foram previamente sensibilizadas com anticorpo (Ac) de captura (anti-MICA humano, 2µg/mL) (100µl) *overnight* (ON), em temperatura ambiente (TA). Após três lavagens (200µl cada) com tampão de lavagem [PBS 1x (*Phosphate-Buffered Saline* -solução salina tamponada; *GIBCO- Life Technologies*, Carlsbad, Califórnia, EUA) contendo 0,05% de Tween 20 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemanha) (pH final=7,2-7,4)], foi realizado o bloqueio da placa com 200µl de tampão de diluição comercial (PBS com 1% albumina de soro bovino – BSA, pH=7,2-7,4; *R&D Systems*, EUA), seguindo-se de incubação por 2h, em TA.

Após três novas lavagens com tampão de lavagem (200µl cada), foram adicionados 100µl dos padrões da proteína MICA nas concentrações acima descritas, previamente diluídas em tampão de diluição, de acordo com o desenho de distribuição da placa. Foram também distribuídos 100µl das respectivas amostras de soro e fluido peritoneal (puras, sem diluição). Após 2h de incubação (TA) e 3 novas lavagens com tampão de lavagem (200µl), foram adicionados 100µl do Ac de detecção (anti-MICA humano biotilado, 400ng/mL) (*R&D Systems*, EUA), seguindo-se de mais 2h de incubação, TA. Após lavagem, foram adicionados 100µl de estreptoavidina conjugada com peroxidase (*R&D Systems*, EUA) (1:200). Após 20min (TA) foram realizadas novas lavagens (200µl de tampão de lavagem) e adição de 100µl da solução de substrato enzimático [ $H_2O_2$  e tetrametilbenzidina (*R&D Systems*, EUA)] (1:1). Após incubação por 20min, em TA, a placa foi bloqueada com 50µl de ácido sulfúrico 2N. A leitura das densidades ópticas (DOs) foi efetuada a 450nm, em Leitora de ELISA (*Bio-Tek Instruments, Inc. - µQuant*, Winooski, Vermont, EUA).

As análises dos dados foram realizadas utilizando-se o programa KC Junior (*Bio-Tek Instruments, Inc.*, Winooski, Vermont, EUA). Para a curva padrão de sMICA foi criada uma curva logística de 4 parâmetros (4-PL), a partir da qual foram gerados os dados das concentrações das amostras teste.

Para análise estatística dos dados, valores abaixo do limite de detecção (31,25pg/mL) foram considerados como 30pg/mL e apresentados ao longo dos resultados como <31,25pg/mL.

### 3.9 Atividade efetora de células NK

A avaliação da atividade efetora de células NK incluiu 3 abordagens de análises:

- i) Análise quantitativa das subpopulações de células NK, frequência (%) e intensidade de expressão (MFI) do receptor NKG2D, e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, nessas subpopulações, na condição *ex vivo*.
- ii) Análise da atividade citotóxica pelas células NK frente a células alvo K562 (linhagem de células de leucemia mieloide crônica humana) (Lozzio e Lozzio 1977) sem bloqueio e com bloqueio para a proteína MICA, na superfície celular.
- iii) Análise da frequência e intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 em subpopulações de células NK, na condição basal - sem estímulo -, na presença de estímulo com células alvo K562 e com células K562 bloqueadas para MICA.

O bloqueio de MICA teve como objetivo representar a presença de MICA solúvel, uma vez que sua presença tem sido descrita como envolvida na diminuição/comprometimento da atividade de células NK (Boukouaci *et al.*, 2013; Groh *et al.*, 2002).

Os ensaios foram realizados utilizando-se PBMC de mulheres com EDT e de CTRs provenientes de laqueadura tubária (CTRs saudáveis), como fonte de células NK efetoras, previamente congeladas e mantidas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

A Figura 7 apresenta o esquema resumido do protocolo envolvendo as células NK.

- **Separação, congelamento e descongelamento de PBMCs**

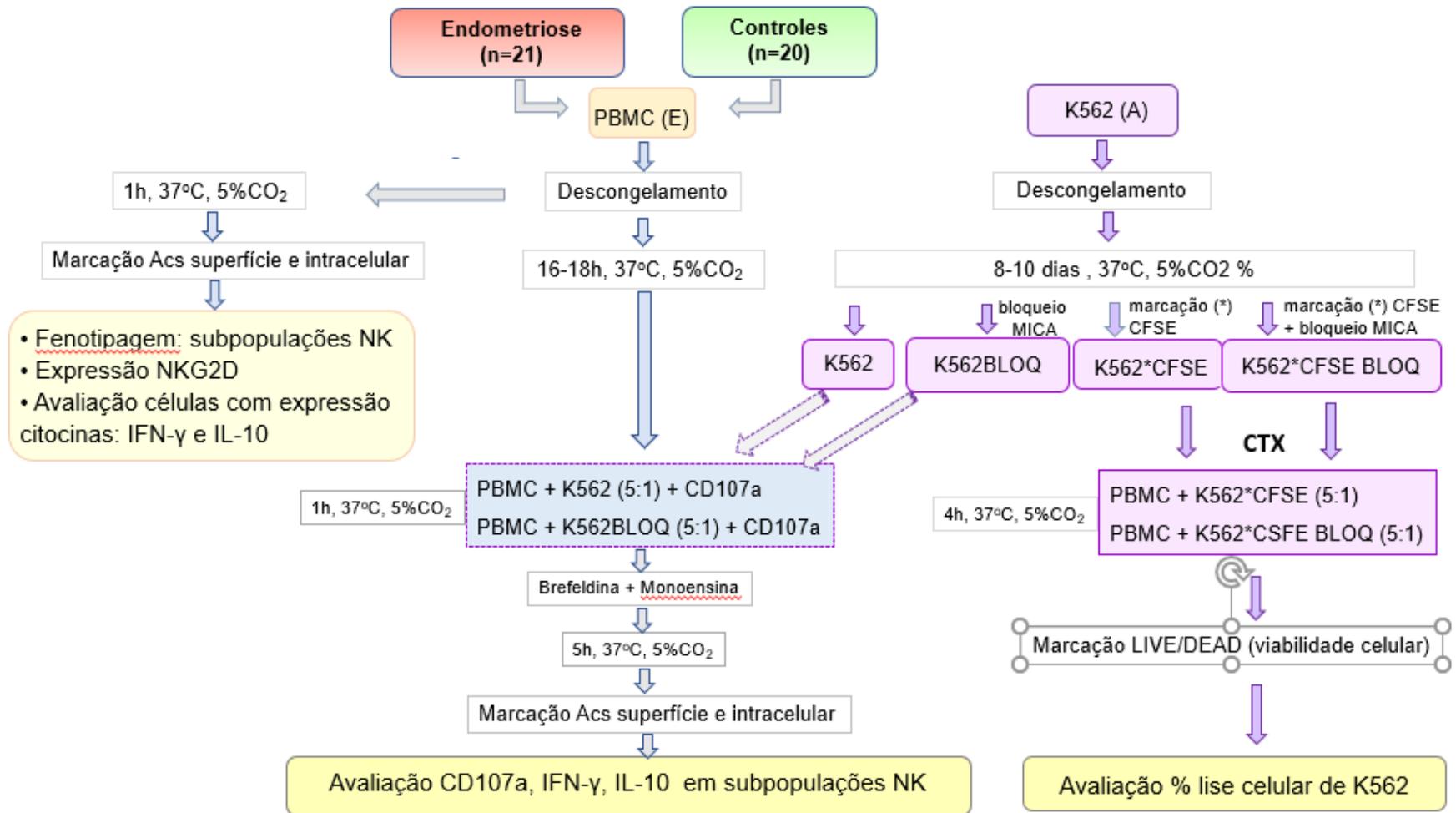
As PBMCs foram isoladas de sangue heparinizado por meio de centrifugação por gradiente de densidade *Histopaque 1077®* (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri, EUA) (Boyum, 1974). Inicialmente, o sangue foi diluído (1:2 a 1:3) em solução fisiológica e, cuidadosamente, colocado sobre 4mL de *Histopaque*, com posterior centrifugação (500g, 30min). A camada da interface (células mononucleares) foi, cuidadosamente, coletada e lavada por 2 vezes (450g, 8min e 100g, 8min), em solução fisiológica.

Em seguida, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e avaliadas quanto à viabilidade celular, utilizando-se o corante vital *Tripán-blue* 0,4% (*Invitrogen*, EUA), na diluição 1:2. Alíquotas de, aproximadamente,  $2 \times 10^6$ –  $8 \times 10^6$  células/mL foram criopreservadas em nitrogênio líquido, em solução contendo 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri, EUA) e 90% de soro bovino fetal (FBS) (*GIBCO-Thermo Fisher*, Massachusetts, EUA).

Para o descongelamento celular, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37°C, até o início do descongelamento. Ainda com pequena “pérola” de gelo, a suspensão celular foi levemente homogeneizada e transferida para um tubo de 15mL com fundo cônico (*Corning, Tamaulipas*, México) contendo 10 mL de meio R10 [meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, *GIBCO-Life Technologies*, Carlsbad,

Califórnia, EUA), contendo 10% soro fetal bovino - FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*, GIBCO- Life Technologies, EUA), 2 mM de L-glutamina (GIBCO- Life Technologies, EUA), 10.000U/mL penicilina-estreptomicina (GIBCO- Life Technologies, EUA), 10mM Hepes (GIBCO- Life Technologies, EUA), 1mM de piruvato de sódio (GIBCO- Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), e 55 $\mu$ M 2-mercaptoetanol (GIBCO- Life Technologies, EUA)], aquecida a 37°C.

A suspensão celular foi centrifugada a 350g, por 8min, seguindo-se de mais uma lavagem (350g, 8min) em 10mL de meio R10. Após esta etapa, foi realizada a contagem de células e análise da viabilidade celular (*Trypan-blue* 0,4%; *Invitrogen*, EUA), em Câmara de Neubauer, e ajuste de concentração para cada ensaio específico.



**Figura 7. Esquema resumido do protocolo para avaliação da atividade efetora de células NK, baseado na degranulação da molécula CD107a, expressão das citocinas IFN-γ e IL-10 e na sua atividade citotóxica.** PBMC: células mononucleares do sangue periférico; *ex vivo*: condição após descongelamento celular e descanso de 1h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sem estímulo; E: células efectoras (PBMCs, fonte de células NK); A: células alvo, K562; h, hora, K562BLOQ: células K562 bloqueadas para a proteína MICA; CFSE: corante fluorescente, do inglês *-Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, K562\*CFSE: células K562 marcadas com o corante fluorescente CFSE, K562\*CFSEBLOQ: células K562 marcadas com CFSE e bloqueadas para a molécula MICA; marcação LIVE/DEAD: marcação com corante LIVE/DEAD™ FixableAqua, para avaliação da viabilidade celular.

Parte das PBMCs descongeladas foi utilizada para imunofenotipagem de células NK, expressão de NKG2D, IFN- $\gamma$  e IL-10 ( $1-2 \times 10^6$  células), na condição *ex vivo*, e parte para o ensaio de atividade efetora de células NK ( $5-10 \times 10^6$  células).

As células para imunofenotipagem de células NK e análise de células produtoras de citocinas foram incubadas por 1h, a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, em 4mL meio R10, em tubo de 15mL, com inclinação de  $\approx 45^\circ$  e tampa afrouxada (considerada condição *ex vivo*).

As células para a análise de atividade efetora de células NK foram incubadas por 16-18h, a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, em tubo de 15mL contendo 4mL meio R10 adicionado de 1 $\mu$ g/mL de DNase (*Sigma Aldrich*, EUA), mantendo a tampa afrouxada.

### **3.9.1 Análise quantitativa das subpopulações de células NK e expressão do receptor NKG2D e das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10, na condição *ex vivo***

Tais análises foram realizadas por citometria de fluxo, em PBMC de mulheres com endometriose (n=21) e de mulheres do grupo controle (n=20).

Após o descongelamento e descanso celular de 1h, foram adicionados 6mL de meio RPMI puro (q.s.p 10mL) ao tubo, seguindo-se de centrifugação (450g, 5min). O botão celular foi ressuspenso em 1mL de PBS1x, seguido de contagem de células e a avaliação da viabilidade celular (*Tripán-blue* 0,4%), em Câmara de Neubauer. Somente células com viabilidade acima de 85% foram utilizadas no experimento.

As reações foram realizadas em tubos para citometria de fluxo, onde foram distribuídos o volume correspondente a  $5 \times 10^5$  células, sempre que possível (mínimo de  $2 \times 10^5$  para cada tubo), por tubo, de acordo com o painel de anticorpos (Acs) a ser utilizado. Posteriormente, foi adicionado 1mL de PBS1x, seguindo-se de centrifugação (450g, 5min) e descarte do sobrenadante. Em seguida, foi realizada a marcação de antígenos de superfície celular (CD3, CD56, CD16 e NKG2D) e intracelulares (IFN- $\gamma$  e IL-10), para cada amostra (EDT ou CTR).

- *Marcação de antígenos de superfície celular*

Para a marcação de antígenos de superfície celular, nas PBMCs, foi utilizado um painel de Acs, previamente titulados, contendo: anti-CD3 APC H-7 (1:30; clone SK7; *BD Biosciences*, EUA), anti-CD16 PE-Cy7 (1:40; clone 3G8; *BD Biosciences*, EUA), anti-CD56 BV421 (1:20; clone NCAM16.2; *BD Biosciences*, EUA), anti-NKG2D Percp Cy5.5 (1:30; clone 1D11; *BD Biosciences*, EUA) e o marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD (AmCyan) (1:100; *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Stain, Invitrogen*, EUA). A mistura de Acs foi preparada em PBS1x, para um volume final de 50 $\mu$ l, considerando-se as diluições de uso de cada Ac, a qual foi distribuída diretamente sobre o botão celular. Como controle negativo de marcação,

utilizamos um tubo com PBMC na ausência de qualquer marcação com Ac (somente com o diluente, PBS 1x).

As células (PBMCs) e os Acs foram homogeneizados e incubados por 30min, em TA, ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 500µl de PBS 1x e a suspensão celular foi novamente centrifugada (450g, 5min), seguindo-se para a marcação de proteínas intracelulares, conforme delineamento do estudo (mapa).

- *Marcação de antígenos intracelulares*

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µl do reagente de fixação celular *A* (*Life Technologies*, EUA), seguindo-se de incubação por 15min, ao abrigo da luz, e posterior adição de 400µl de tampão de lavagem para citometria (PBS-1x + 2% Soro Fetal Bovino + 0,02% Azida Sódica) e centrifugação (450g, 5min). Em seguida, foram adicionados 50µL de uma mistura contendo os Acs anti-IL-10 PE (1:10; clone JES3-19F1; *BD Biosciences*, EUA) e anti-IFN- $\gamma$  APC (1:30; clone 4SW.B3; *Biolegend*, San Diego, Califórnia, EUA), diluídos na solução *B* de permeabilização (*Life Technologies*, EUA) de acordo com o título previamente definido em titulação.

Como controle negativo para as fluorescências dos Acs IL-10 e IFN- $\gamma$ , foi utilizada a estratégia *Fluorescence Minus One* (FMO), onde foram colocados todos os Acs monoclonais do painel do experimento, exceto para um desses Acs, conferindo seus respectivos controles (Roederer, 2001).

Após a adição da mistura de Acs intracelulares, os tubos foram incubados por 40min, TA, ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 400µl de tampão de lavagem para citometria, seguindo-se de nova centrifugação (450g, 5min). As células foram então ressuspensas em 400µl de tampão de lavagem para citometria e mantidas a 4°C, até a aquisição em citômetro de fluxo.

- *Aquisição das amostras e análise por citometria de fluxo*

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto™II (*BD Biosciences*, EUA), utilizando-se o programa BD FACSDiva v.6.1.3 (*BD Biosciences*, EUA). Inicialmente, foi realizada uma análise das condições eletrônicas e ópticas do equipamento, utilizando-se o reagente *Cytometer Setup e Tracking* (CST, *BD Biosciences*, EUA). Para a compensação dos *lasers*, foi utilizada uma mistura de microesferas, negativa (sem capacidade de ligação; BD™ CompBead Plus Negative Control -BSA) e de microesferas que se ligam à cadeia leve K da imunoglobulina (*CompBeads anti-mouse IgK*; *BD Biosciences*, EUA), as quais foram marcadas com os fluorocromos utilizados no ensaio.

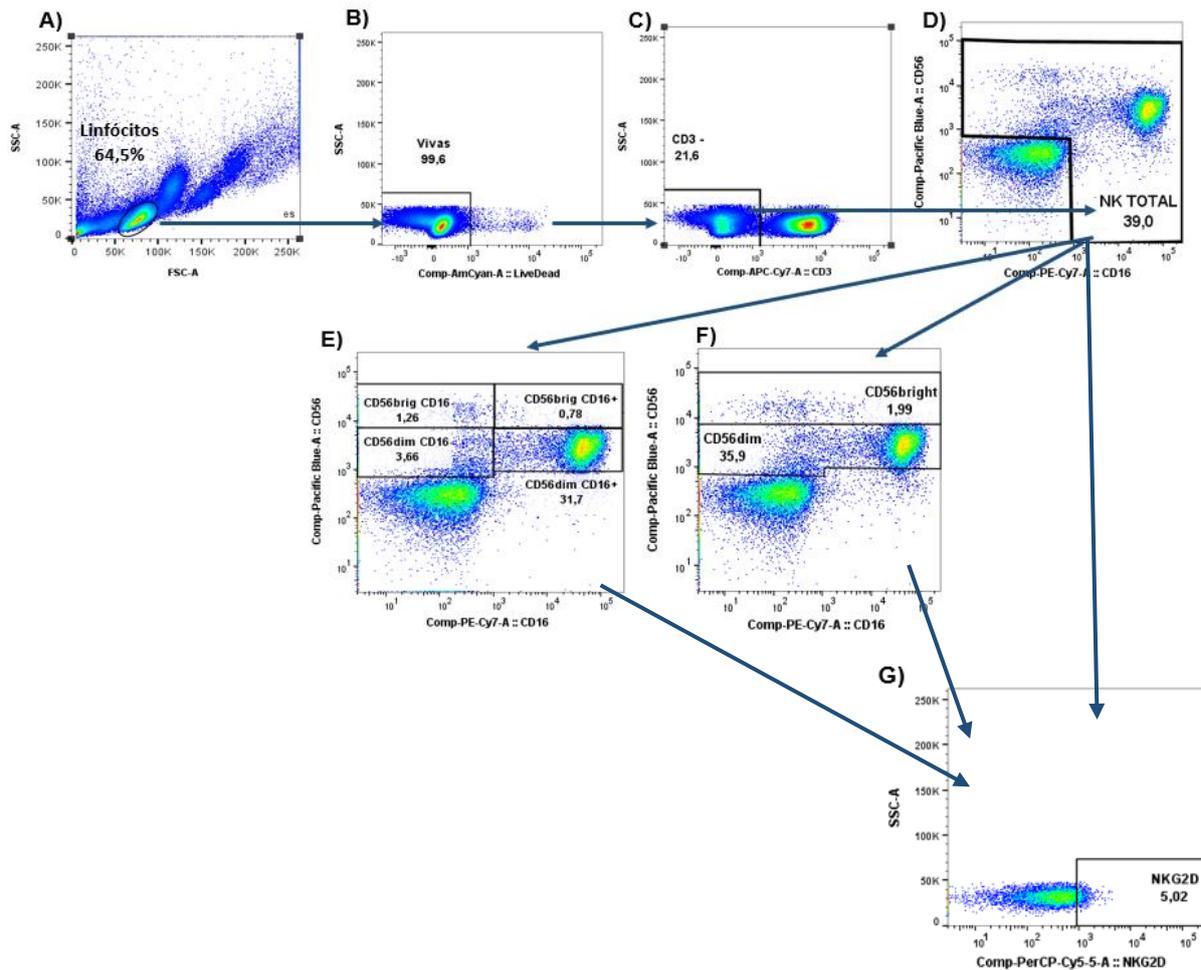
Em seguida, foi definida uma região em linfócitos (*gate*), com base nos parâmetros de dispersão frontal do *laser* (FSC, *Forward Scatter*, correspondente ao tamanho celular) e de dispersão lateral do *laser* (SSC, *Sider Scatter*, correspondente à complexidade/granulosidade

celular). As células NK apresentam as mesmas características morfológicas correspondentes à FSC e SSC de linfócitos, tendo sido adquiridos, em citômetro de fluxo, um total mínimo de  $2 \times 10^5$  eventos (células) nesta região, para posterior análise.

- *Estratégia de análise*

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa FlowJo v.10 (*Tree Star*, Ashle, Oregon, EUA).

Inicialmente, foi selecionada a região de linfócitos, com base nos parâmetros FSC-A (*Forward Scatter Area*) e de dispersão lateral do laser, SSC-A (*Sider Scatter Area*). Em seguida, foi selecionada a região com células vivas, identificada com o uso do marcador de viabilidade *LIVE/DEAD* (AmCyan) (Invitrogen, EUA). Na região de células vivas, foram então selecionadas células negativas para a marcação com o Ac anti-CD3 (CD3<sup>-</sup>). As células de interesse, NK, são caracterizadas fenotipicamente como CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+/-</sup>. A partir das células CD3<sup>-</sup>, as células NK foram identificadas utilizando-se os parâmetros CD16 (eixo X) vs CD56 (eixo Y). A partir das células CD56<sup>+</sup>, foram discriminadas as subpopulações CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>. Dentro destas subpopulações, foram ainda discriminadas as subpopulações CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>. Foram avaliadas também as células NK totais, que incluem: subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>. Para todas as subpopulações, foram avaliadas a frequência (%) de células com expressão, e a mediana de intensidade de expressão (MFI), do receptor NKG2D e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. A estratégia de análise para determinação das subpopulações de células NK e do receptor NKG2D, está apresentada na Figura 8. A estratégia de análise da % de subpopulações de células NK com expressão, e a da intensidade de expressão para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 (marcação intracelular), estão apresentadas adiante, na Figura 9 (item 3.9.2.2).



**Figura 8. Estratégia de análise para determinação das subpopulações de células NK circulantes e subpopulações NK com expressão de NKG2D, de mulheres com endometriose e controles. A)** dispersão frontal (tamanho) (FSC-A, *Forward Scatter Area*) e dispersão lateral (granularidade) (SSC-A, *Sider Scatter Area*) para determinação da região de linfócitos; **B)** determinação de viabilidade celular – seleção de células vivas; **C)** seleção de células CD3<sup>-</sup> (exclusão de CD3<sup>+</sup>); **D)** identificação de subpopulações de células NK totais, que incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; **E)** identificação de subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>; **F)** identificação de subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>, na presença ou ausência da molécula CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>); **G)** expressão de NKG2D, a partir das subpopulações identificadas nas regiões apresentadas nos itens E e F.

### 3.9.2 Análise da atividade efetora de células NK frente a estímulo com células K562

Como parte do ensaio funcional, as moléculas CD107a (representando a degranulação de vesículas – liberação de granzima e perforina) e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 (representando a ativação de células NK), foram avaliadas quanto à suas frequências (%) e intensidades da expressão (MFI) nas subpopulações de células NK, frente ao estímulo com células K562.

Essas análises foram realizadas com PBMCs (fonte de células NK) de mulheres do grupo ETD (n= 21) e do grupo CTR (n= 20) nas condições: **i)** frente a células K562 (estímulo com células K562), **ii)** frente a células K562 na presença de bloqueio para a proteína MICA

(estímulo com células K562BLOQ), representando a presença MICA solúvel, **iii**) na ausência de estímulo (sem células K562), apenas PBMCs.

### 3.9.2.1 Cultivo de células K562 e bloqueio da proteína MICA na superfície celular

- *Cultivo de células K562*

As células K562 utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Mari Sogayar (Núcleo de Terapia Celular e Molecular – NUCEL, USP). Após o descongelamento (mesmo protocolo de descongelamento de PBMCs, item 3.9), as células foram mantidas em meio R10 (garrafas de 250mL; *Nunc*, Rochester, New York, EUA), por 8-10 dias de cultura, com troca de meio, em média, a cada 2 dias. Em seguida, as células foram recuperadas e lavadas por centrifugação (300g, por 8min), em meio R10, e ressuspensas em 2mL de PBS 1x. Após esta etapa, foi realizada a contagem de células e verificação da viabilidade celular com o corante vital *Trypan Blue* 0,4%, utilizando-se Câmara de *Neubauer*. Somente suspensões celulares com viabilidade acima de 85% foram utilizadas para os experimentos.

- *Bloqueio da proteína MICA na superfície celular*

Para o bloqueio da proteína MICA na superfície das células K562, foi utilizado o Ac anti-MICA não marcado (MAB1300, *mouse anti-human IgG<sub>2B</sub>*, clone 159227; *R&D Systems*, EUA), na diluição 1:10 (em PBS 1x), previamente titulado (ANEXO VI). Foram bloqueadas, em média,  $1 \times 10^6$  células K562, para cada amostra (EDT ou CTR), para a composição dos ensaios. Considerando-se o número de amostras a serem analisadas, o volume correspondente a  $0,5 \times 10^6$  de células K562 foi transferido para 2 poços de uma placa estéril de fundo U (*Nunc*, EUA). Os poços foram completados com PBS 1x (q.s.p. 200  $\mu$ l), seguindo-se de centrifugação a 450g, por 5min. Após o completo descarte do sobrenadante (inversão), foram adicionados 50 $\mu$ l do Ac anti-MICA 1:10, diretamente ao botão celular, seguindo-se com leve homogeneização, com micropipeta. Após incubação por 30min (TA), o volume de cada poço foi transferido para um tubo de 15mL estéril, com lavagem de cada poço (PBS 1x), para recuperação celular.

Após centrifugação (450g, por 5min), as células K562 foram ressuspensas em 1mL de meio R10, seguindo-se de contagem celular e verificação da viabilidade celular (*Trypan Blue* 0,4%) em Câmara de *Neubauer*.

### 3.9.2.2 Análise da expressão de MICA em células K562 pré e pós o bloqueio de MICA

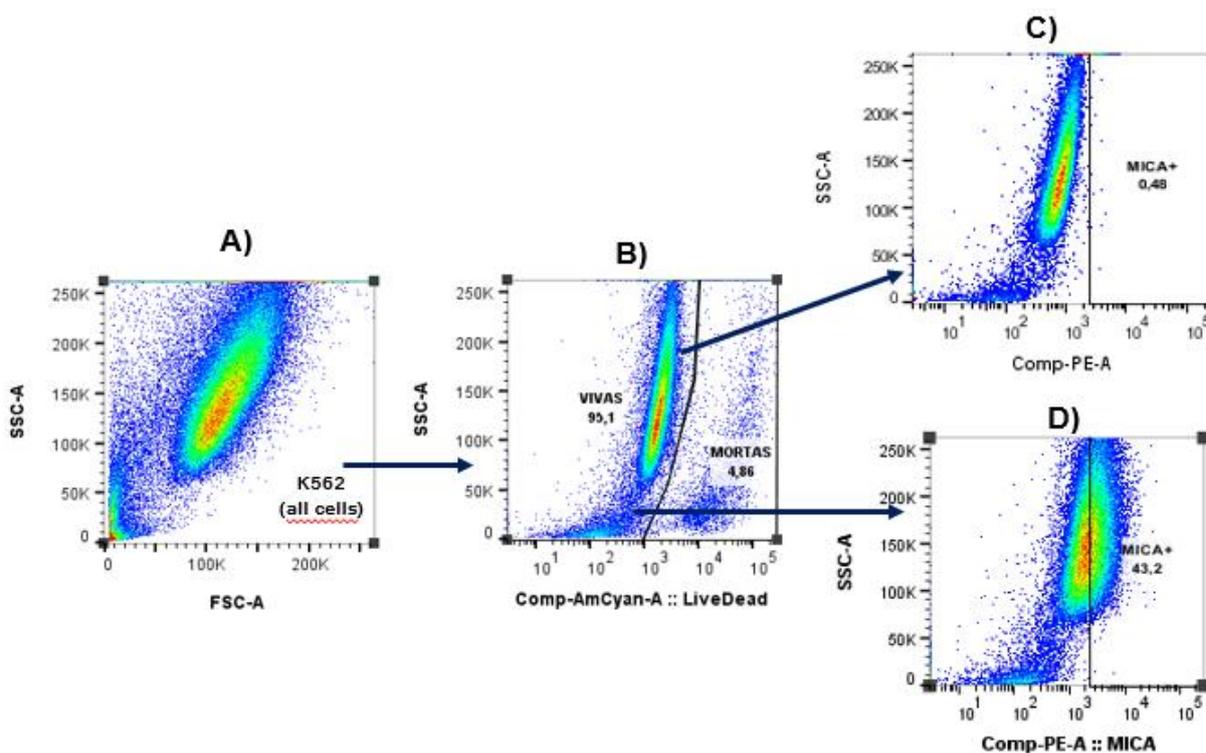
A expressão da proteína MICA foi avaliada, antes e após o bloqueio de MICA, com o objetivo de verificar a eficiência do bloqueio. A expressão foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando-se o Ac anti-MICA PE, previamente titulado (1:50, em PBS1x) (Anexo VI) (FAB1300, *mouse anti-human IgG<sub>2</sub>, PE-conjugated anti-MICA*, clone 159227; R&D Systems, EUA), o qual reconhece o mesmo epítipo antigênico do Ac anti-MICA não marcado (mesmo clone, 159227) utilizado para o bloqueio de MICA na superfície de células K562. Um total de  $2-5 \times 10^5$  células (com e sem bloqueio) foi transferido para tubos de citometria de fluxo e a marcação da proteína MICA foi realizada segundo o protocolo de marcação para antígenos de superfície celular, acima descrito (item 3.9.1). Neste mesmo teste, foi também incluído o marcador de viabilidade celular *LIVE/DEAD* (1:100, em PBX 1x). Como controle negativo de expressão de MICA, foi incluído apenas a suspensão celular de K562, com e sem bloqueio, na ausência de Ac anti-MICA-PE (apenas o diluente, PBS 1x).

A aquisição das células K562 foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto™II utilizando-se o programa BD *FACSDiva*, v.6.1.3. Inicialmente, foi realizada a análise das condições eletrônicas e ópticas do equipamento, e a compensação dos *lasers* (conforme item 3.9.1) utilizando-se a mistura de microesferas BD™ CompBeads (*BD Biosciences*, EUA) marcadas com os mesmos fluorocromos utilizados neste ensaio.

Após a compensação dos *lasers*, foi realizada a aquisição de  $2 \times 10^5$  células K562 com base nos parâmetros FSC-A (*Forward Scatter Area*) e de dispersão lateral do *laser*, SSC-A (*Sider Scatter Area*) considerando-se o total de células (*all cells*).

- *Estratégia de análise*

A análise da expressão de MICA em células K562 foi realizada utilizando-se o programa *FlowJo* v.10 (*Tree Star*, EUA). A expressão foi avaliada em células K562, com e sem bloqueio para MICA, no conjunto total de células adquiridas (*all cells*). Inicialmente, foi selecionada a região com células vivas, por meio do marcador de viabilidade *LIVE/DEAD*. As células vivas são fracamente marcadas, correspondendo às células descoladas para a esquerda do eixo X. Na Figura 9 está apresentada a estratégia de análise da expressão de MICA em células K562.



**Figura 9. Estratégia de análise para expressão de MICA em células K562. A)** células K562 totais (*all cells*), de acordo com dispersão frontal (tamanho) (FSC-A, *Forward Scatter Area*) e dispersão lateral (granularidade) (SSC-A, *Sider Scatter Area*); **B)** determinação de viabilidade celular – seleção de células vivas, por meio do corante *LIVE/DEAD*; **C)** região de corte para MICA: controle negativo para expressão de MICA; **D)** expressão positiva para MICA, com base na região de corte do controle negativo.

### 3.9.2.3 Frequência e intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10, nas subpopulações de células NK

A frequência de células que expressam *CD107a*, *IFN- $\gamma$*  e *IL-10*, e suas intensidades de expressão, foram avaliadas em células efetoras (E): NK totais, subpopulações  $CD56^{\text{bright}}$  e  $CD56^{\text{dim}}$ , e nas subpopulações  $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ ,  $CD56^{\text{dim}}CD16^-$ ,  $CD56^{\text{bright}}CD16^+$ ,  $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ , nas condições: **i)** sem estímulo, **ii)** com estímulo de células alvo (A) K562, **iii)** com estímulo de células alvo (A) K562 bloqueadas para MICA. A proporção de células E:A para ensaio de cocultura foi definida em ensaio prévio como 5:1 (Anexo X).

Após o descongelamento e lavagem (item 3.9), as PBMCs foram ressuspensas em 4mL de meio R10 com  $1\mu\text{g/mL}$  de DNase (*Sigma Aldrich*, Saint Louis, Missouri, EUA) (tubo de 15mL) e foram mantidas em repouso por 16-18h, em posição inclinada  $45^\circ$ , com tampas afrouxadas, a  $37^\circ\text{C}$ , em incubadora umidificada e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após o período de incubação, as suspensões de PBMCs e de células K562, que estavam mantidas em cultura, foram centrifugadas (450g, 8min) e ressuspensas em meio R10, contadas e verificadas quanto a sua viabilidade (*Tripan-blue* 0,4%), em Câmara de *Neubauer*. Parte das células K562 foram bloqueadas para a proteína MICA (K562BLOQ), segundo o item

3.9.2.1. As células K562 tiveram sua concentração e viabilidade celular, novamente, avaliadas após o bloqueio para MICA.

Uma vez avaliadas as concentrações de células vivas de PBMCs, células K562 e K562BLOQ, foi calculado o volume de cada suspensão celular (efetora e alvo) a ser utilizada no ensaio, de forma a manter a proporção E:A (PBMC:K562) de 5:1, sendo fixada, sempre que possível, a quantidade de  $1 \times 10^5$  de células alvo. Os volumes foram transferidos para uma placa de cultura celular de 96 poços, fundo U, de acordo com o mapa do experimento. Como controle de morte celular para PBMCs e células K562 (com e sem bloqueio) e da expressão espontânea de CD107a e de citocinas (controle negativo) em PBMC, tanto células K562 como PBMC foram incluídas no ensaio sem qualquer estímulo, apenas com meio R10. Como controle positivo de morte de células alvo, foi incluído no ensaio um poço com células K562 acrescidas de Tween 20 (0,1% final) (*Merck & Co.*, EUA). Para cada amostra de PBMC do estudo (EDT e CTR), sempre que possível, devido ao número limitante de células, foi incluído um poço como controle positivo de ativação de células NK, com estímulo de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato,  $1 \mu\text{g/mL}$ ) e ionomicina ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) (*Sigma Aldrich*, EUA).

Após a distribuição das células, de acordo com o mapa do experimento, foi adicionado  $1 \mu\text{l}$  do Ac anti-CD107a FITC (*BD Biosciences*, EUA). A adição desse Ac, no início da cocultura, teve como objetivo garantir que qualquer expressão de CD107, após degranulação pela célula NK, pudesse ser detectada. A expressão de CD107 na superfície celular é uma medida da degranulação (granzima e perforina) de vesículas intracelulares por linfócitos, incluindo células NK (Aktas *et al.*, 2009). O volume final foi ajustado para  $200 \mu\text{l}$ , com meio R10. Em seguida, as placas foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$ , por 1h, em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ .

Após este período de incubação, foram adicionados  $0,5 \mu\text{l}$  de brefeldina A (*BD GolgiPlug*; *BD Biosciences*, EUA) e  $0,5 \mu\text{l}$  de monensina (*Golgi-Stop*; *BD Biosciences*, EUA) nos poços correspondentes, seguindo-se de nova incubação por mais 5 h, a  $37^\circ\text{C}$ , em 5% de  $\text{CO}_2$ . A adição de monensina tem como objetivo inibir o transporte de proteínas do retículo citoplasmático para o complexo de Golgi (Mollenhauer *et al.*, 1990). A brefeldina A tem a mesma função, porém bloqueia o transporte proteico numa etapa anterior à monoensina (Fujiwara *et al.*, 1988). Portanto, ambas permitem o acúmulo intracelular de proteínas, facilitando sua detecção em células produtoras com a utilização de marcação fluorescente, na análise por citometria de fluxo.

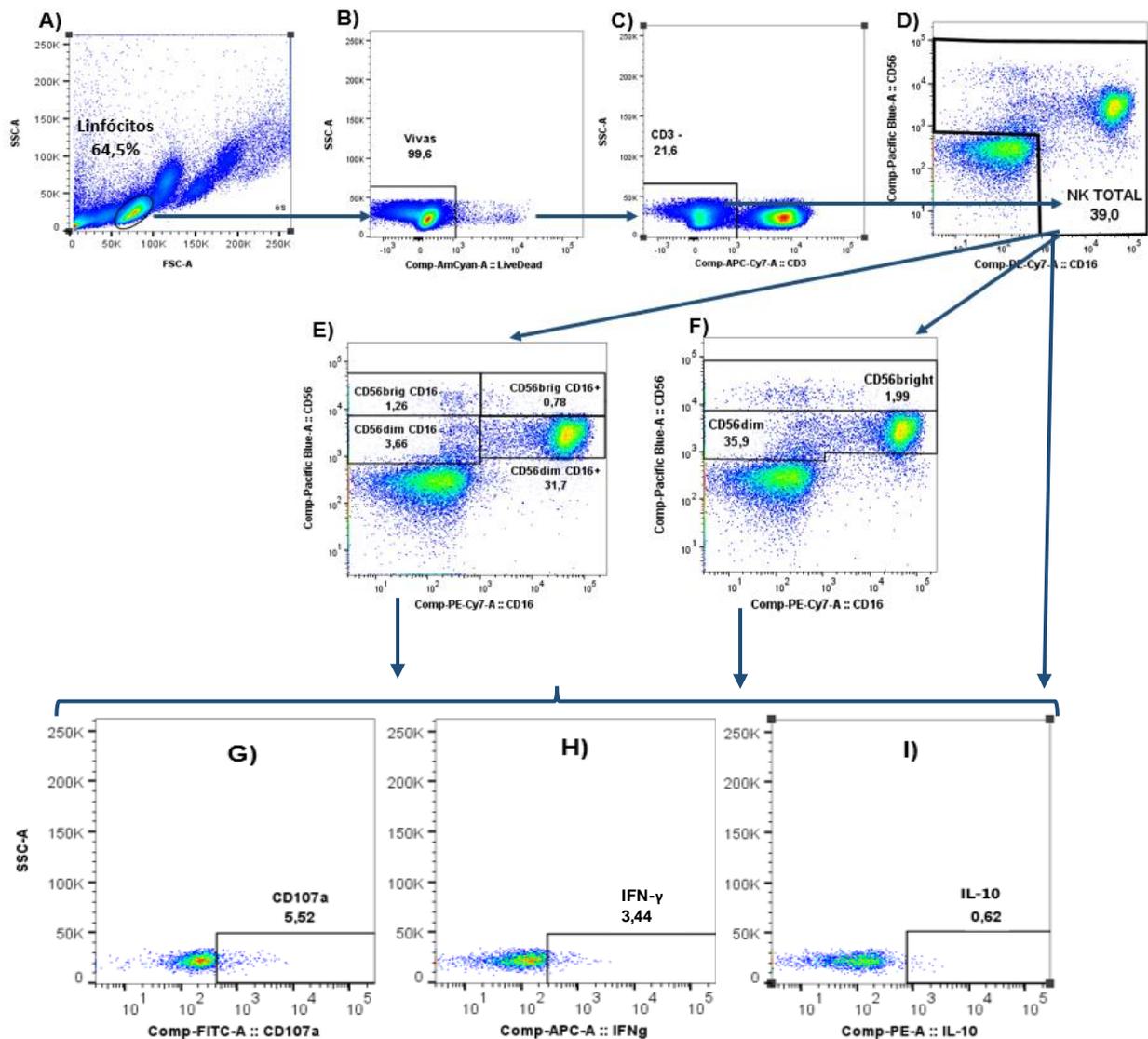
Após a incubação total de 6h, a placa foi centrifugada (450g, 5min) e o sobrenadante descartado por inversão rápida. As células foram ressuspensas em  $200 \mu\text{l}$  de tampão PBS1x e transferidas para tubos de citometria. Após mais uma lavagem com PBS1x (450g, 5min), deu-se seguimento à marcação de antígenos de superfície e intracelulares com Acs marcados com fluorocromos específicos, segundo o protocolo descrito acima (item 3.9.1).

Para a marcação de antígenos de superfície foi utilizado o mesmo painel de Acs utilizado no ensaio na condição *ex vivo*, exceto o Ac NKG2D: anti-CD3 APC H-7 (1:30), anti-CD16 PE-Cy7 (1:40), anti-CD56 BV421 (1:20) e o marcador de viabilidade celular *LIVE/DEAD*

(1:100; LIVE/DEAD™ *Fixable Aqua Stain*, Invitrogen, EUA). Para a marcação de IFN- $\gamma$  e IL-10 (intracelulares) foram utilizados os mesmos Acs, previamente descritos para a condição *ex vivo* (IFN- $\gamma$  APC e IL-10 PE). A marcação para CD107a ocorrera previamente, com a adição do Ac anti- CD107a FITC na primeira hora de incubação da cocultura.

Como controle negativo para as fluorescências dos Acs IL-10 e IFN- $\gamma$ , e para CD107a (como parte da cocultura), foi utilizada a estratégia *Fluorescence Minus One* (FMO), onde foram colocados todos os Acs monoclonais do painel do experimento, exceto para um desses Acs, conferindo seus respectivos controles (Roederer, 2001).

Após a análise das condições eletrônicas e ópticas do equipamento, e da compensação dos *lasers* (já descritos no item 3.9.1), foi realizada a aquisição das células da cocultura (PBMC + K562) (mínimo de  $2 \times 10^5$  células, em *all cells*) com base nos parâmetros FSC-A e SSC-A. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa *FlowJo* v.10. A estratégia de análise está apresentada na Figura 10.



**Figura 10. Estratégia de análise para determinação das subpopulações de células NK circulantes, com expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, em mulheres com endometriose e controles. A)** dispersão frontal (tamanho) (FSC-A, *Forward Scatter Area*) e dispersão lateral (granularidade) (SSC-A, *Sider Scatter Area*) para determinação da região de linfócitos; **B)** determinação de viabilidade celular – seleção de células vivas; **C)** seleção de células CD3- (exclusão de CD3+); **D)** identificação de subpopulações de células NK totais, que incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; **E)** identificação de subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>; **F)** identificação de subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>, na presença ou ausência da molécula CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>); **G)** expressão de CD107a, a partir das subpopulações identificadas nos itens E e F; **H)** expressão de IFN- $\gamma$ , a partir das subpopulações identificadas nos itens E e F; **I)** expressão de IL-10, a partir das subpopulações identificadas nos itens E e F.

### 3.10 Avaliação da atividade citotóxica de células NK

A capacidade citotóxica de células NK de mulheres com EDT (n=21) e de mulheres saudáveis do grupo CTR (n=20) foi avaliada após cocultura de PBMC (fonte de células NK efectoras, E) com células alvo (A) K562 e com células K562 bloqueadas para a proteína MICA (K562BLOQ). O bloqueio para MICA no ensaio teve como objetivo representar a presença de

MICA solúvel, descrito como com envolvimento na diminuição da atividade citolítica de células NK e T citotóxicas (Boukouaci *et al.*, 2013; Groh *et al.*, 2002). A análise foi realizada por citometria de fluxo, avaliando-se a frequência (%) de morte das células alvo, K562.

Inicialmente, as células K562 foram marcadas com o corante fluorescente éster succinimidílico da carboxifluoresceína, CFSE (K562\*CFSE), com o objetivo de discriminá-las das PBMCs, na cocultura. Após a marcação com CFSE, parte das células foi também bloqueada para a molécula MICA, conforme descrito no item 3.9.2.1

### 3.10.1 Marcação das células K562 com CFSE

Foram marcadas com CFSE,  $2 \times 10^5$  células K562 vivas, para cada ensaio com paciente (EDT ou CTR). As células K562 que estavam sendo mantidas em cultura (8-10 dias) foram recuperadas em tubos plásticos de 15mL e lavadas por centrifugação com meio RPMI sem soro (450g, 8min). Após o descarte total do sobrenadante, as células K562 foram ressuspensas em 10mL de PBS 1x, e novamente lavadas (450g, 5min) para a eliminação de qualquer possível resíduo de soro (proteína) contido no meio de cultura R10 e que pudesse gerar ligação inespecífica com CFSE. Em seguida, as células K562 foram ressuspensas em PBS 1x, contadas e avaliadas quanto à sua viabilidade (*Trypan-Blue*, 04%), em Câmara de *Neubauer*.

Para a marcação de CFSE, o total de  $2 \times 10^5$  células K562 vivas foi dividido em 4 tubos de 15mL ( $0,5 \times 10^5$  células cada). Os tubos foram completados para 5mL com PBS1x, e submetidos a nova centrifugação (450g, 8min). O sobrenadante de cada tubo foi cuidadosamente descartado, seguindo-se com inversão do tubo sobre papel absorvente, para descarte total do diluente. Em seguida, foram adicionados 500µl de uma solução de CFSE 0,3µM, diretamente sobre no botão celular, seguindo com incubação, por 10min, a 37°C, ao abrigo da luz, com homogeneização após os primeiros 5min. Após esta incubação, foram adicionados 5mL de meio R10 à suspensão celular, com o objetivo de parar a reação. A suspensão celular foi novamente incubada por mais 10min, TA, ao abrigo da luz. Em seguida, o tubo foi centrifugado (450g, 8min) e as células K562 ressuspensas em meio R10, para posterior contagem e avaliação de viabilidade celular com *Trypan-blue* 0,4% (Câmara de *Neubauer*). Somente suspensões celulares de células K562 com viabilidade acima de 85% foram utilizadas no ensaio.

### 3.10.2 Cocultura de PBMC: K562 (E:A) e marcação para morte celular

As PBMCs de mulheres do grupo EDT e do grupo CTR foram previamente descongeladas e mantidas por 16-18h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, em 4mL de meio R10 (volume final de 4mL) com 1µg/mL de DNase (Sigma Aldrich, EUA) em tubo de 15mL, com inclinação de ≈45° e tampa afrouxada (obs.: mesmas amostras utilizadas na avaliação de células com expressão de CD107a, IFN-γ e IL-10, item 3.9.2.3). Em seguida, as células foram lavadas em meio R10 (q.s.p 15mL, 450g, 8min), contadas (Câmara de *Neubauer*) e avaliadas quanto à sua viabilidade celular com *Tripan-blue* 0,4%. Somente as suspensões de PBMCs com viabilidade acima de 85% foram utilizadas no ensaio.

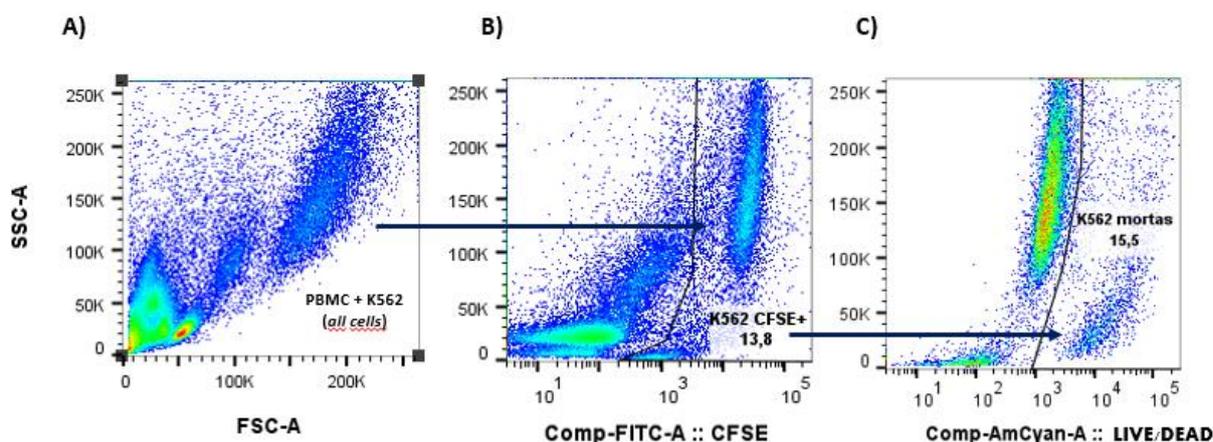
As células efectoras (E) PBMCs (fonte de células NK) foram então incubadas com células alvo (A) K562 marcadas com CFSE e também com células marcadas com CFSE e bloqueadas para MICA, na proporção 5:1 (E:A) em placa de cultura estéril de 96 poços, fundo U (Nunc, EUA), conforme mapa de distribuição, previamente preparado para o ensaio. As células foram cultivadas num volume total de 200µl de meio R10, tendo sido utilizadas 20.000 células-alvo. Como controle positivo de morte celular, foram utilizadas células K562 na presença de *Tween20* 0,1% e, como controle de morte espontânea, foram utilizadas as células K562 (marcadas com CFSE, com e sem bloqueio para MICA) cultivadas apenas na presença de meio R10. Em cada ensaio, foi também incluído um poço contendo apenas PBMC (1x10<sup>5</sup> células), de forma a avaliar a viabilidade celular no final do experimento, com a marcação do marcador *LIVE/DEAD* AmCyan.

Após cultura de 4h, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, a placa foi centrifugada (450g, 5min) e as suspensões celulares (células da cocultura, células K562 e PBMC sozinhas) foram transferidas para tubos de citometria de fluxo, previamente identificados. Após lavagem com PBS1x (400µL) e descarte do sobrenadante, foram adicionados 50µl de uma mistura com marcador de viabilidade celular *LIVE/DEAD* (1:100), em PBS1x, diretamente sobre o botão celular. A marcação seguiu o protocolo para marcação de antígenos de superfície celular (item 3.9.1). As células K562 (controles, cultivadas somente com meio R10) foram avaliadas quanto à expressão proteica de MICA, utilizando-se o Ac anti-MICA (FAB 1300, 1:50). O protocolo de marcação, aquisição e análise da expressão de MICA em células K562 está descrito acima, no item 3.9.2.2

A marcação de células K562 e K562BLOQ cultivadas sozinhas (sem PBMC) com o marcador de viabilidade *LIVE/DEAD* indicou a frequência (%) de morte espontânea dessas células. Quando presente na cocultura com PBMC (do grupo EDT ou CTR), a frequência (%) de morte de células K562 correspondeu à morte específica na amostra. A atividade citotóxica de células NK da amostra foi avaliada pela frequência (%) de morte de células K562, calculada pela fórmula:

$$\frac{\% \text{ K562 mortas na amostra} - \% \text{ morte K562 espontânea}}{100 - (\% \text{ morte K562 espontânea})} \times 100$$

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa *FlowJo* v.10 e a estratégia de análise para citotoxicidade de células NK contra células K562 (com e sem bloqueio para MICA) está apresentada na Figura 11.



**Figura 11. Estratégia de análise para determinação da atividade citotóxica de células NK contra células K562.** **A)** gráfico representativo de todas as células E:A adquiridas (*all cells*); **B)** gráfico representativo de células K562 positivas para a marcação CFSE (corante fluorescente éster succinimidílico da carboxifluoresceína); **C)** gráfico representativo de células K562 positivas para CFSE e para o marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD, indicando células mortas; E: células PBMC efetoras (fonte de células NK); A: células alvo K562; PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

### 3.11 Análise estatística

A análise da normalidade de distribuição dos dados foi realizada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações de variáveis contínuas e com distribuição normal foram realizadas pelo teste paramétrico Teste *t* e apresentadas por média e desvio padrão. As variáveis sem distribuição normal, foram analisadas pelos testes não-paramétricos *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de Dunn (quando mais de 2 comparações) e foram apresentadas por medianas com valores de mínimo e máximo. A análise dos dados das variáveis qualitativas (nominais e ordinais) entre os grupos com e sem endometriose, foram comparadas pelo teste *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) ou teste exato de *Fisher*, quando aplicável ( $n \leq 5$ ). Para a análise de correlação entre os dados foi utilizado o teste não paramétrico de *Spearman*.

Para os níveis de sMICA, no soro e no fluido peritoneal, foram criadas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para gerar um ponto de corte com melhor sensibilidade e especificidade que pudesse discriminar as mulheres com EDT, em relação às mulheres do grupo CTR. A acurácia/desempenho do teste é representada pela área sob a curva (AUC,

*Area Under Curve*), uma vez que a mesma leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade para cada valor da variável do teste (sMICA). Quanto maior o poder do teste em discriminar as mulheres com EDT, das do grupo CTR, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo, no ponto que representa a sensibilidade e 1 - especificidade do melhor valor de corte (Lopes *et al.*, 2014). Desta forma, foram considerados ideais os valores de AUC que se mais se aproximaram de 1, sendo que valores  $0,7 \leq AUC < 0,8$  foram considerados como de discriminação aceitáveis (Tape, 2015).

Para as análises estatísticas dos dados de sMICA, valores abaixo do limite de detecção (31,25pg/mL) foram considerados como 30pg/mL.

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Programa, Inc.*, EUA), exceto para a curva ROC, realizada utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for Social Science*), versão 22. Foram considerados significantes os valores de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

---

#### 4. RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as características clínicas e demográficas das mulheres do grupo EDT e mulheres do grupo CTR, participantes do presente estudo.

**Tabela 1.** Características clínicas e demográficas das mulheres com endometriose e controles.

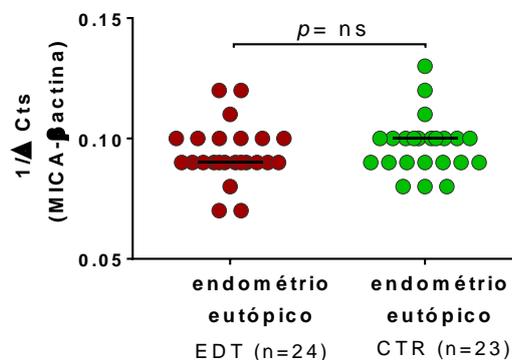
Variáveis	EDT (n=173)	CTR (n=86)	p
<b>Idade (mediana, min-max)</b>	35 (21-50)	34 (21-50)	ns*
<b>Infertilidade</b>	87 (50,3)	0 (0,0)	<0,0001
<b>Dismenorreia</b>	161 (93,0)	19 (22,0)	<0,0001
<b>Dispareunia de profundidade</b>	123 (71,1)	4 (4,7)	<0,0001
<b>Dor pélvica crônica</b>	84 (48,6)	8 (9,3)	<0,0001
<b>Alteração intestinal cíclica</b>	146 (84,4)	7 (8,1)	<0,0001
<b>Alteração urinária cíclica</b>	57 (32,9)	0 (0,0)	<0,0001
<b>Fase do ciclo</b>			
proliferativa	24 (13,9)	42 (48,8)	ns
secretora	44 (25,4)	32 (37,2)	ns
desconhecida	36 (20,8)	12 (13,9)	
<b>Estádio da EDT</b>			
I	24 (13,9)	NA	
II	42 (24,3)	NA	
III	33 (19,1)	NA	
IV	74 (42,7)	NA	
<b>Tipo de EDT</b>			
SUP	13 (7,5)	NA	
OVA	11 (6,4)	NA	
PROF	108 (62,4)	NA	
PROF + OVA	41 (23,7)	NA	

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle (laqueadura tubária, n=60 e doenças não inflamatórias, n=26, que incluem: mioma, n=16; mioma na presença de cisto benigno ovariano, n=3; lise de aderências, n=1; laparoscopia diagnóstica sem achado clínico, n=6); EVA: escala visual analógica de dor; estádios da endometriose de acordo com *Revised American Society for Reproductive Medicine* (rASRM, 1996); I: EDT mínima; II: EDT leve; III: EDT moderada; IV: EDT grave; SUP: lesões na superfície do peritônio; OVA: endometriose ovariana, com ou sem doença peritoneal e sem endometriose profunda; PROF: endometriose profunda com ou sem endometriose peritoneal e sem endometriose ovariana; PROF + OVA: endometriose profunda na presença de OVA; valores indicados para os grupos EDT e CTR são representados pelo número em cada grupo, de acordo com a variável e porcentagem correspondente, em parênteses – n (%), exceto para a variável idade; NA: não se aplica; valores de p determinados pelo teste de qui-quadrado ou exato de *Fischer*, \*valor de p determinado pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.1 Expressão gênica de *MICA*

A análise de expressão do gene *MICA* (mRNA) foi realizada no endométrio eutópico das mulheres com EDT (n=24) e de CTRs saudáveis, sem EDT e que foram submetidas à laqueadura tubária (n=23). A análise foi realizada por qRT-PCR e o cálculo da quantificação relativa pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), considerando-se a eficiência individual de amplificação de *primers* para o gene *MICA* e o gene  $\beta$ -actina, como gene endógeno para normalização do teste. Os valores médios de Cts das triplicatas testadas referentes à amplificação desses genes, os valores correspondentes de  $\Delta$ Ct e as características clínicas das mulheres com e sem EDT, estão apresentados no Anexo VII, Tabela 1.

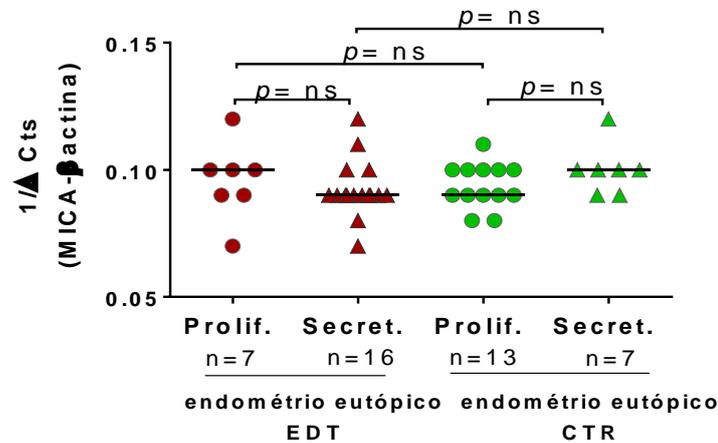
Na Figura 12 estão apresentados os valores de  $1/\Delta$ Ct nos respectivos endométrios eutópicos. Tais valores referem-se à diferença entre as médias de Ct da expressão do gene *MICA* e do gene  $\beta$ -actina. A comparação da expressão gênica entre os dois grupos não mostrou diferença significativa ( $p= 0,3427$ , teste de *Mann-Whitney*): EDT, média, 0,094 ( $\pm 0,01$ ) e mediana, 0,09 (0,07-0,12, min-max); CTR, média, 0,097 ( $\pm 0,01$ ) e mediana, 0,1 (0,08-0,13, min-max).



**Figura 12. Expressão de mRNA de *MICA* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles.** Expressão de mRNA de *MICA* normalizada pelo gene endógeno  $\beta$ -actina; valores de  $\Delta$ Ct representados como  $1/\Delta$ Ct; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; as barras horizontais representam a mediana; valor de  $p$  determinado pelo teste de *Mann-Whitney*; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); os valores de  $\Delta$ Ct foram representados por  $1/\Delta$ Ct, de forma a indicarem valores crescentes quanto à expressão gênica.

A expressão do gene *MICA* também foi avaliada nas diferentes fases do ciclo menstrual. Sete mulheres do grupo EDT estavam na fase proliferativa (1º ao 14º dia do ciclo), (7/24, 29,2%), 16 na fase secretora (15º ao 28º dia do ciclo) (16/24, 66,7%) e, para 1 (1/24, 4,1%), não foi possível obter a informação. No grupo CTR, 13 mulheres estavam na fase proliferativa (13/23, 56,5%), 7 na fase secretora (7/23, 30,4) e, em 3 casos (3/23, 13%), não foi possível obter a informação. Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de mRNA de *MICA* ( $1/\Delta$ C) em endométrio, tanto para o grupo EDT ( $p= 0,3456$ ) como para o

grupo CTR ( $p= 0,2377$ ), entre as diferentes fases do ciclo menstrual. A comparação entre os grupos EDT e CTR, tanto na fase proliferativa como na secretora, também não mostrou diferença da expressão do gene *MICA* (EDT:  $p= 0,7409$ ; CTR:  $p= 0,0596$ ) (teste de *Mann-Whitney*) (Figura 13).



**Figura 13. Expressão do gene *MICA* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual.** Prolif: fase proliferativa (1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia); Secret: fase secretora (15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia); EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle;  $\Delta$ Ct: diferença entre a expressão do gene alvo, *MICA*, e o gene normalizador endógeno,  *$\beta$ -Actina*; as barras horizontais representam a mediana; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

## 4.2 Expressão proteica de *MICA*

A análise da expressão da proteína *MICA* foi realizada por imunohistoquímica em 29 mulheres com EDT profunda e em 22 mulheres CTRs saudáveis, provenientes de laqueadura tubária, por laparoscopia. No grupo EDT foi realizada pesquisa da proteína *MICA* em tecido de endométrio eutópico e de lesão de EDT profunda (15 casos de lesão de retossigmóide e 14 de retrocervical) e, no grupo CTR, no endométrio eutópico.

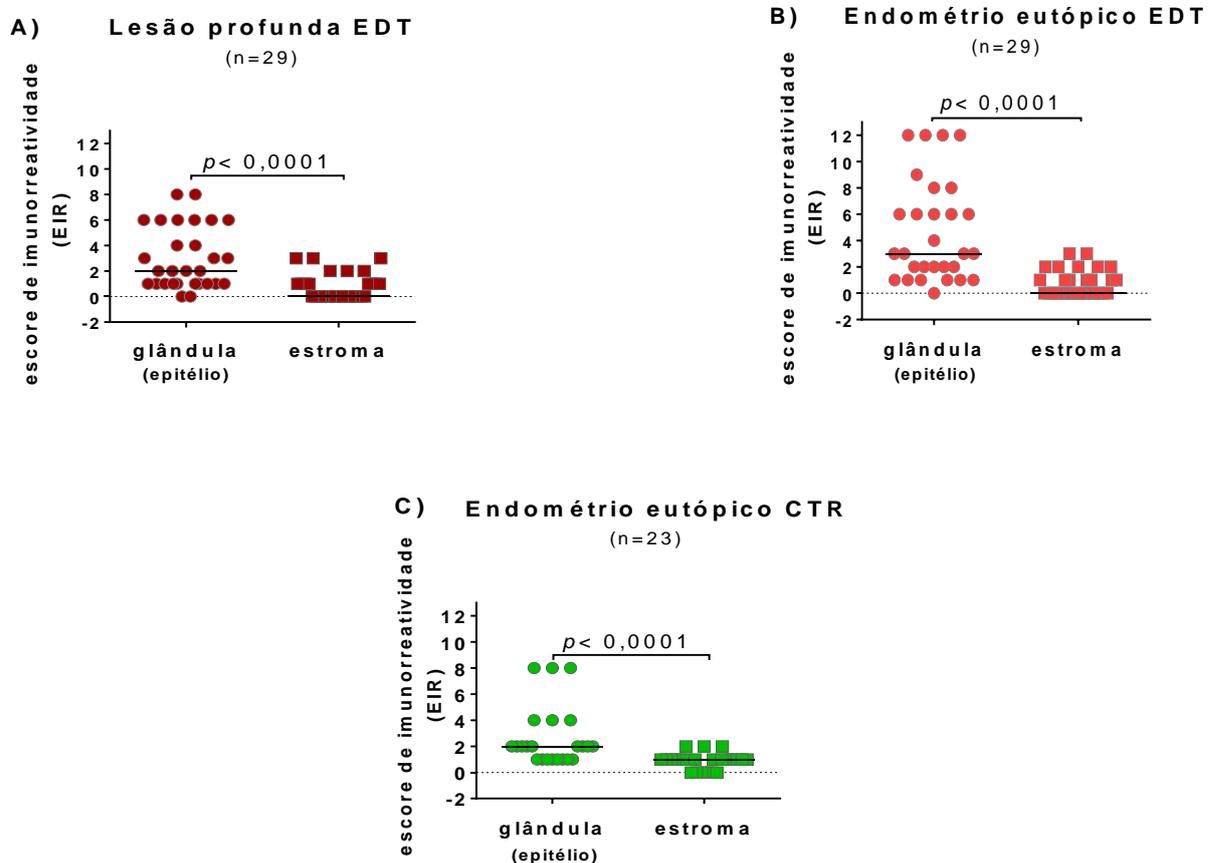
As análises foram baseadas na intensidade de expressão e frequência de positividade de marcação (%) para a proteína *MICA*, avaliadas tanto em epitélio glandular como no estroma. Foi calculado um escore de imunorreatividade (EIR) para ambos (epitélio glandular e estroma), definido pela multiplicação do escore de intensidade de expressão de *MICA* pelo escore de frequência da expressão de *MICA* (descrito em Métodos, item 3.7.1).

### 4.2.1 Expressão proteica de *MICA* no epitélio glandular e estroma

A expressão de *MICA* no epitélio glandular e no estroma foi baseada no EIR de *MICA* (escore da intensidade x escore da frequência) (descrito em Métodos, item 3.7.1). A expressão no epitélio glandular foi maior que a expressão no estroma, tanto no endométrio do grupo CTR

[mediana 2 (1-8, min-max) vs 1 (0-2, min-max);  $p < 0,0001$ ], como na lesão profunda de EDT [mediana 2 (0-8, min-max) vs 0 (0-3, min-max);  $p < 0,0001$ ] e no endométrio eutópico de mulheres com EDT [mediana 3 (0-12, min-max) vs 0 (0-3, min-max),  $p < 0,0001$ ] (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*) (Figura 14).

Os valores de média e mediana dos escores de imunorreatividade em glândula e estroma estão apresentados na Tabela 2. Na Figura 15 estão exemplos representativos da expressão da proteína MICA nos tecidos de lesão endometrial e de endométrio eutópico de mulheres com EDT e do grupo CTR. Os escores de frequência e intensidade de expressão da proteína MICA em epitélio glandular e estroma, individualizados, para o grupo EDT e CTR, e dados clínicos estão no Anexo VIII, Tabela 1.

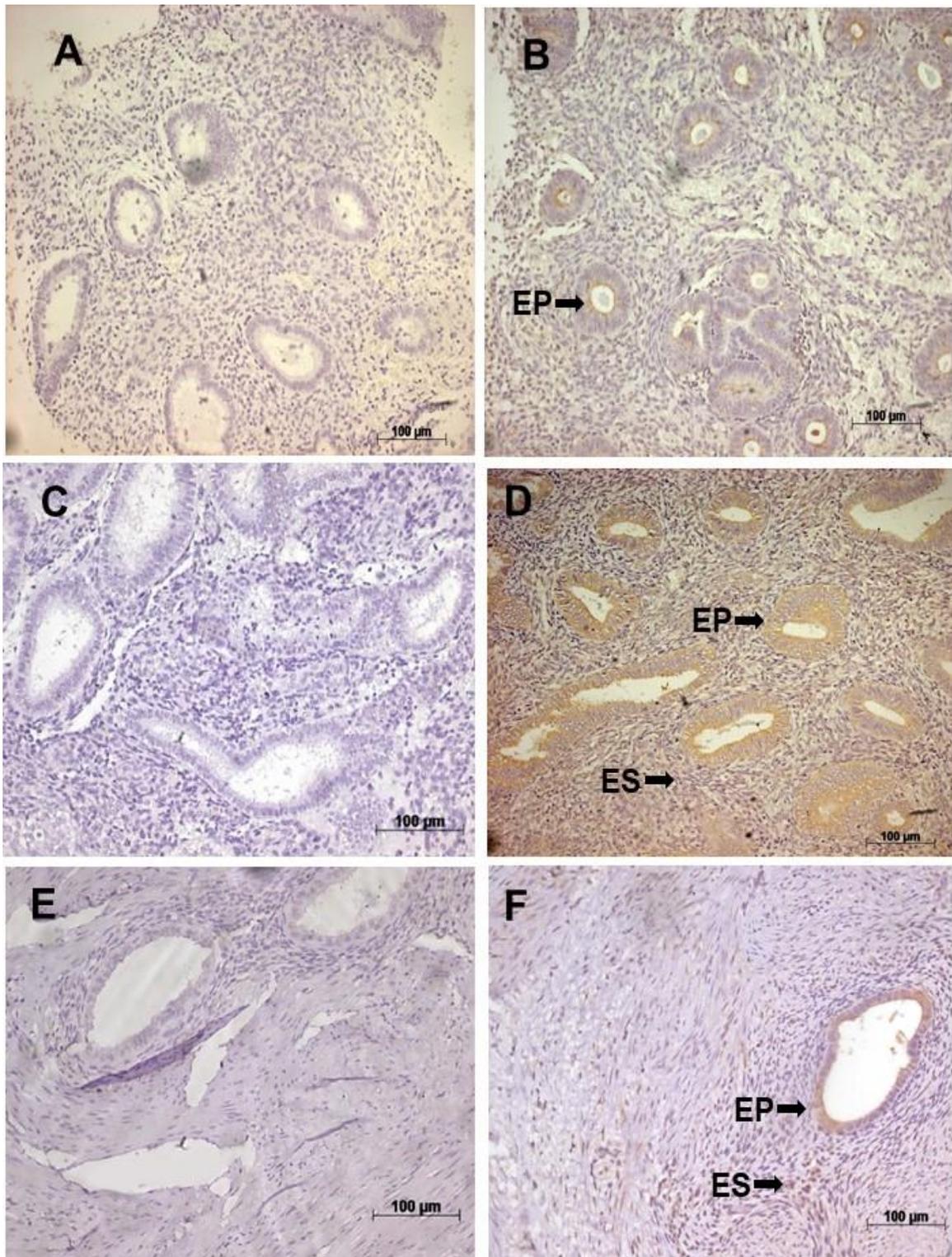


**Figura 14. Escore de imunorreatividade para expressão proteica de MICA em glândula (epitélio) e estroma, e representação da expressão em endométrio eutópico. A)** lesão profunda de EDT; **B)** endométrio eutópico de mulheres com EDT; **C)** endométrio eutópico de mulheres CTRs saudáveis; EIR: escore de imunorreatividade, definido pela multiplicação do escore de intensidade de expressão de MICA pelo escore de frequência da expressão de MICA; as barras horizontais representam a mediana; linha pontilhada: valor zero para EIR; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; reação de imunohistoquímica; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 2.** Escore de imunorreatividade para epitélio glandular e estroma da expressão da proteína MICA, na lesão profunda de endometriose e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e controles.

ENDOMETRIOSE						CONTROLES		
Código EDT	Tecido	Lesão		Endométrio eutópico		Código CTR	Endométrio eutópico	
		EIR Glândula	EIR Estroma	EIR Glândula	EIR Estroma		EIR Glândula	EIR Estroma
P 86	RC	0	0	1	0	C 43	1	1
P 99	RC	1	0	1	0	C 44	2	1
P 103	RC	2	0	4	2	C 45	2	1
P 104	RC	3	0	12	0	C 47	1	1
P105	RC	4	0	8	2	C 48	1	1
P 108	RC	6	1	6	1	C 85	1	1
P 110	RC	2	1	12	2	C 51	2	2
P 118	RC	3	1	12	2	C 57	1	1
P 119	RC	6	2	2	1	C 79	1	1
P 121	RC	6	3	2	1	C 58	2	2
P 124	RC	8	3	6	3	C 60	2	2
P 143	RC	1	0	1	0	C 61	1	1
P 149	RC	0	0	6	0	C 63	2	1
P 187	RC	6	1	1	0	C 64	2	1
P 188	RC	1	0	1	0	C 84	2	1
P 78	RS	6	2	6	2	C 68	1	1
P 79	RS	3	1	3	1	C 80	2	1
P 96	RS	1	0	9	0	C 71	8	0
P 97	RS	2	2	1	0	C 70	4	0
P 100	RS	1	1	3	0	C 73	8	0
P 126	RS	0	0	3	0	C 75	8	0
P 128	RS	8	3	2	3	C 83	4	0
P 139	RS	0	0	2	0	C 86	4	0
P 144	RS	3	0	6	0			
P 147	RS	1	0	2	1			
P 158	RS	2	0	12	0			
P 185	RS	1	1	1	1			
P 186	RS	1	1	3	1			
P 189	RS	4	0	8	0			
<b>Média</b>		3,00	0,79	4,66	0,79		2,70	0,87
<b>(DP)</b>		(2,45)	(1,01)	(3,85)	(0,98)		(2,3)	(0,63)
<b>Mediana</b>		2	0	3	0		2,0	1,0
<b>(min-máx)</b>		(0-8)	(0-3)	(0-12)	(0-3)		(1-8)	(0-2)

ID: identificação das participantes do estudo; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; RC: lesão de endometriose retrocervical (n=15); RS: lesão de endometriose retossigmóide (n=14); DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; glândula: epitélio glandular; EIR: escore de imunorreatividade (definido pelo escore de intensidade de expressão de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão de MICA).



**Figure 15. Exemplos representativos de expressão da proteína MICA, por imunohistoquímica, em lesão de retossigmoide e em endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles. A)** Endométrio eutópico de mulher controle saudável, controle negativo da reação; **B)** Endométrio eutópico de mulher controle saudável com marcação de MICA em epitélio glandular (EP) (seta); **C)** Endométrio eutópico de mulher com endometriose, controle negativo da reação; **D)** Endométrio eutópico de mulher com endometriose com marcação de MICA em epitélio glandular (EP) e estroma (ES) (setas); **E)** Lesão de endometriose profunda de retossigmoide, controle negativo da reação; **F)** Lesão de endometriose profunda de retossigmoide, com marcação de MICA em epitélio glandular (EP) e estroma (ES) (setas); Objetiva 20 x.

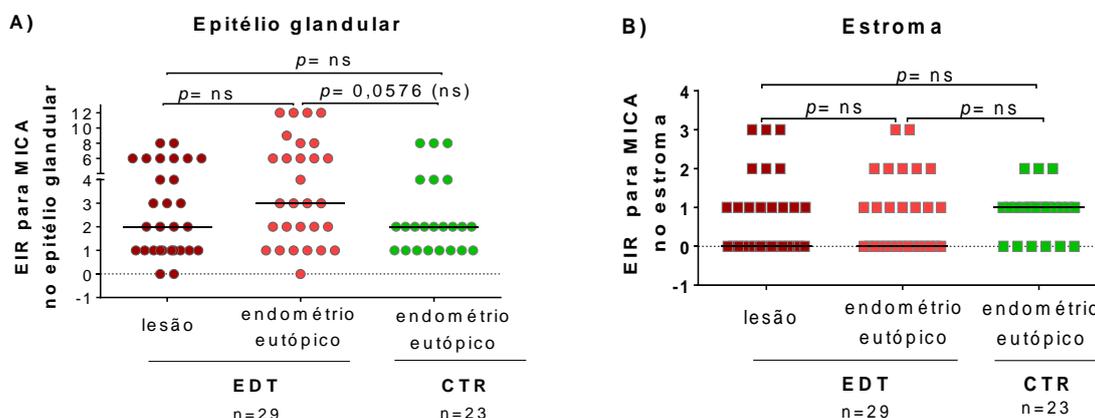
Na comparação da expressão de MICA entre os diferentes tecidos (EDT e/ou CTR) não observamos diferenças significativas, tanto na glândula como no estroma (teste de *Mann-Whitney*) (Figura 16):

#### EIR glandular (epitélio glandular):

- lesão vs endométrio eutópico EDT,  $p=0,1029$
- lesão vs endométrio CTR,  $p=0,8925$
- endométrio eutópico EDT vs endométrio eutópico CTR,  $p=0,0576$

#### EIR estromal:

- lesão vs endométrio eutópico EDT,  $p=0,9829$
- lesão vs endométrio CTR,  $p=0,3182$
- endométrio eutópico EDT vs endométrio eutópico CTR,  $p=0,3795$ .

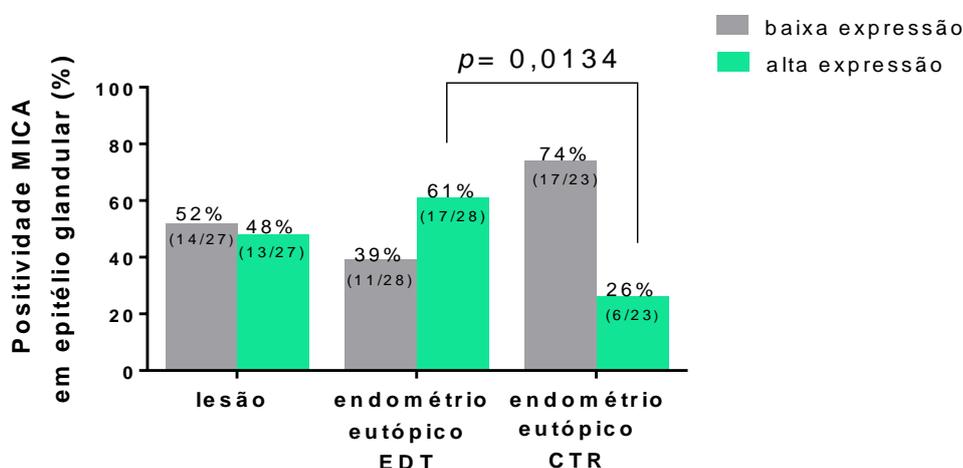


**Figura 16. Comparação dos escores de imunorreatividade (EIR) de expressão de MICA na lesão profunda, endométrio eutópico de mulheres dos grupos endometriose e controle. A) EIR glandular (epitélio); B) EIR estromal; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore da intensidade de expressão de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; end.: endométrio; lesão: lesão profunda de EDT; análise realizada por imunohistoquímica; as barras horizontais representam a mediana; linha pontilhada: valor zero para EIR; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

Tomando-se o epitélio glandular como base de análise, foi observado que 93,1% (27/29) das mulheres com EDT tiveram positividade em lesão (endométrio ectópico) e 96,55% (28/29) em endométrio eutópico. Todos os casos positivos para expressão de MICA na lesão foram também positivos no endométrio eutópico, pareado. Apesar de EIRs mais baixos (não significantes), 100% das mulheres do grupo CTR (23/23) apresentaram alguma positividade no epitélio glandular do endométrio eutópico.

Os escores de imunorreatividade em epitélio glandular foram também avaliados em relação ao nível de expressão, “alto” ou “baixo”, tomando-se como base a mediana de expressão do grupo CTR (mediana= 2,0). Assim, consideramos escores < 2,0, como baixa expressão e, > 2,0, como alta expressão. Do total de 27 casos positivos na EDT para

expressão de MICA na lesão, 13 (48%) foram considerados como de alta expressão e 14 (52%) como de baixa expressão. No endométrio eutópico das mulheres do grupo EDT, do total de 28 casos positivos, 17 (61%) tiveram alta expressão e 11 (39%), baixa expressão de MICA. No endométrio eutópico das mulheres do grupo CTR, apesar de todos serem positivos para expressão de MICA ( $n=23$ ), somente 6 (26%) tiveram alta expressão. Assim sendo, a frequência de expressão proteica de MICA considerada “alta” no endométrio eutópico de mulheres do grupo EDT foi maior do que a frequência de expressão “alta” no endométrio do grupo CTR ( $p=0,0134$ , teste de *qui-quadrado*). No entanto, não foram observadas diferenças para as frequências de “alta” ou “baixa” expressão de MICA entre a lesão e endométrio eutópico de mulheres com EDT ( $p=0,3495$ ) e endométrio CTR ( $p=0,1092$ ) (teste de *qui-quadrado*) (Figura 17).



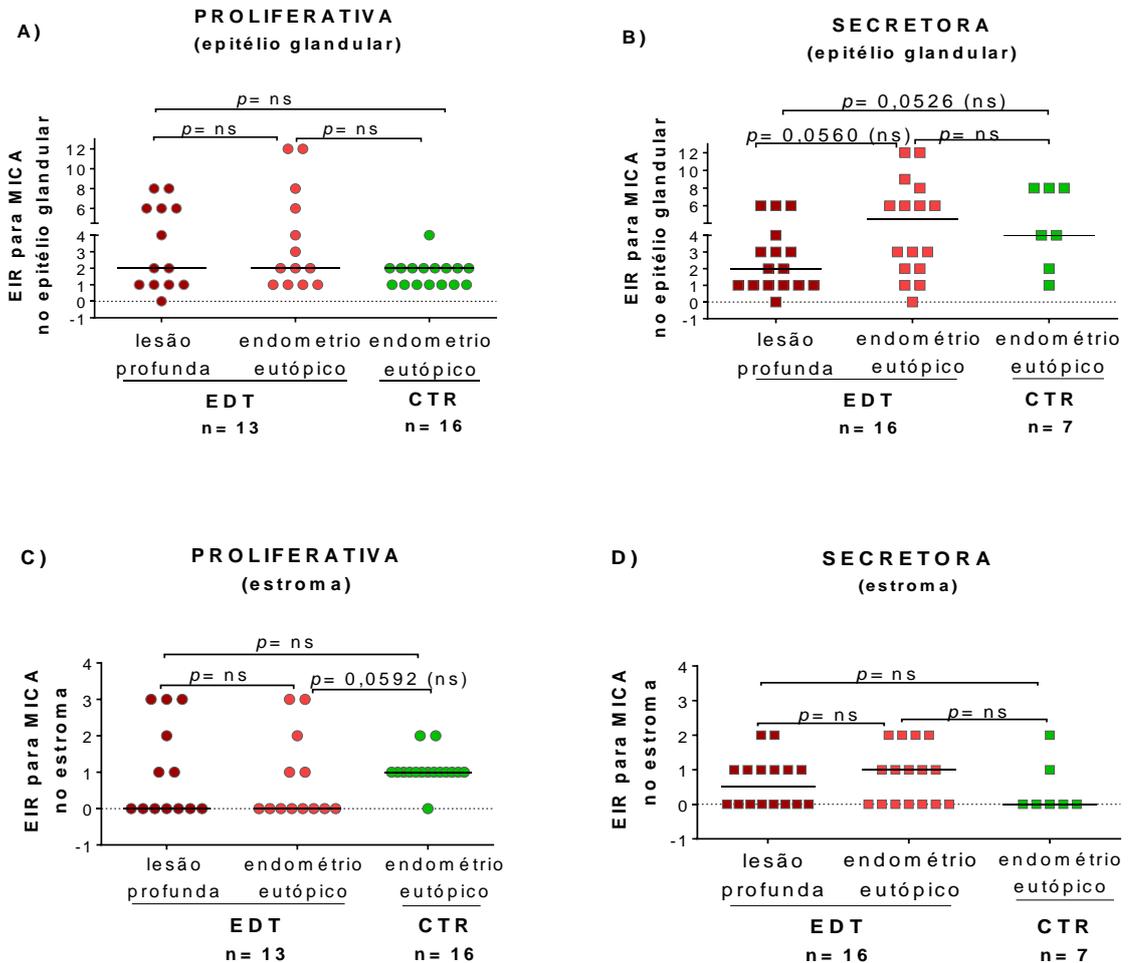
**Figura 17. Porcentagem de casos positivos com baixa ou alta expressão proteica de MICA no epitélio glandular, de acordo com os escores de imunorreatividade (EIR).** Reação de imunohistoquímica; expressão proteica de MICA baseada na mediana do EIR do grupo controle (baixa,  $< 2$ ; alta,  $> 2$ ); análise em casos considerados positivos para expressão no epitélio (lesão profunda de EDT,  $n=27$ ; endométrio eutópico de mulheres com EDT,  $n=28$ ; endométrio eutópico de mulheres CTR,  $n=23$ ); EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore da intensidade de expressão de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; valor de  $p$  determinado pelo teste de *qui-quadrado*.

#### 4.2.2 Expressão proteica de MICA em relação à fase do ciclo menstrual

Do total de 29 mulheres do grupo EDT estudadas para a expressão proteica de MICA, 13 (45%) estavam na fase proliferativa (estrogênica) do ciclo menstrual e 16 (55%) na fase secretora (progestacional). No grupo CTR, 16/23 (70%) estavam na fase proliferativa e 7/23 (30%) na fase secretora.

Comparamos a expressão de MICA, tanto no epitélio glandular como no estroma, nos diferentes tecidos dos grupos de estudo (lesão profunda e endométrio eutópico de mulheres do grupo EDT e endométrio de mulheres do grupo CTR). Não observamos diferença na expressão de MICA tanto no epitélio glandular como no estroma ( $p > 0,05$ , teste de *Mann-*

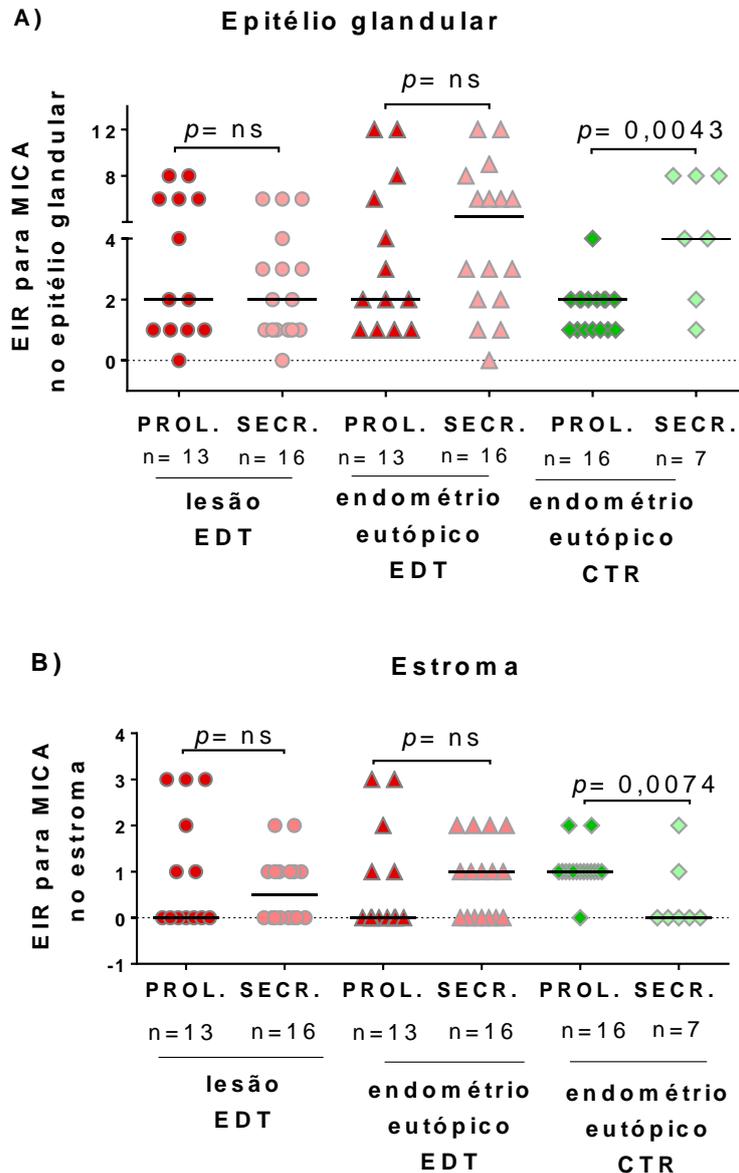
*Whitney*) nem na EDT (lesão vs endométrio eutópico) nem entre EDT e CTRs (lesão ou endométrio eutópico de mulheres com EDT vs endométrio eutópico de mulheres CTRs) (Figura 18). A estatística descritiva (média e mediana) dos escores representativos no epitélio glandular e estroma dos grupos EDT e CTR, está apresentada no Anexo VIII, Tabela 2A.



**Figura 18. Escores de imunorreatividade de expressão proteica de MICA no epitélio glandular e estroma na lesão profunda e endométrio eutópico de mulheres do grupo endometriose e no endométrio eutópico de mulheres do grupo controle, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. A) EIR de expressão de MICA no epitélio glandular, na fase proliferativa; B) EIR de expressão de MICA no epitélio glandular, na fase secretora; C) EIR de expressão de MICA no estroma, na fase proliferativa; D) EIR de expressão de MICA no estroma, na fase secretora; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão proteica de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; as barras horizontais representam a mediana; fase proliferativa: 1<sup>o</sup>– 14<sup>o</sup> dia do ciclo; fase secretora: 15<sup>o</sup> – 30<sup>o</sup> dia do ciclo; análise realizada por imunohistoquímica; linha pontilhada: valor de zero para EIR; ns: valor de *p* não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

Na comparação da expressão de MICA nos tecidos entre as fases do ciclo, considerando o epitélio glandular e o estroma, observamos diferenças significantes apenas para o grupo CTR (Figura 19). Encontramos **maior expressão de MICA no epitélio glandular**

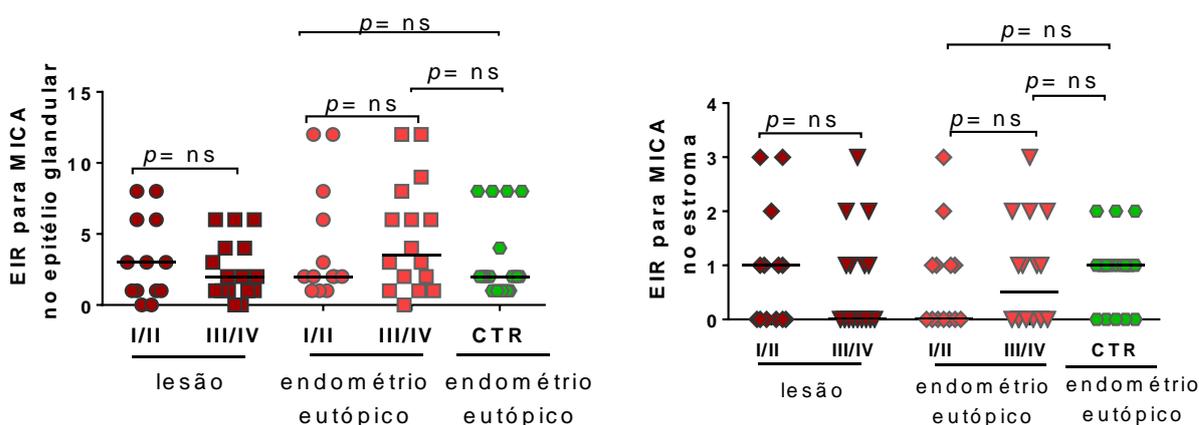
do **endométrio eutópico do grupo CTR**, na fase **secretora** do ciclo ( $p= 0,0043$ ). No entanto, no **estroma do endométrio eutópico de CTR**, observamos **maior expressão** de MICA na fase **proliferativa** do ciclo ( $p= 0,0074$ ) (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*). A estatística descritiva dos escores representativos nas fases do ciclo menstrual está apresentada em Anexo VIII, Tabela 2B.



**Figura 19. Comparação da expressão de MICA entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na lesão de endometriose profunda e nos endométrios eutópicos de mulheres com endometriose e de controles. A)** expressão de MICA no epitélio glandular; **B)** expressão de MICA no estroma; CTR: grupo controle; PROL: fase proliferativa (1<sup>o</sup> - 14<sup>o</sup> dia do ciclo); SECR: fase secretora (15<sup>o</sup> - 30<sup>o</sup> dia do ciclo); EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão proteica de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; as barras horizontais representam a mediana; linha pontilhada: valor zero para EIR; análise realizada por imunohistoquímica; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

### 4.2.3 Expressão proteica de MICA em relação aos estádios da endometriose

A expressão de MICA na lesão profunda e no endométrio eutópico de mulheres com EDT, considerando o epitélio glandular e estroma não mostrou perfil diferencial entre os estádios iniciais (I/II) e os avançados da doença (III/IV), e desses, em relação ao grupo CTR ( $p > 0,05$ , teste *Mann-Whitney*) (Figura 20). A estatística descritiva total (epitélio glandular e estroma) dos escores representativos dos estádios da doença está apresentada no Anexo VIII, Tabela 2C.



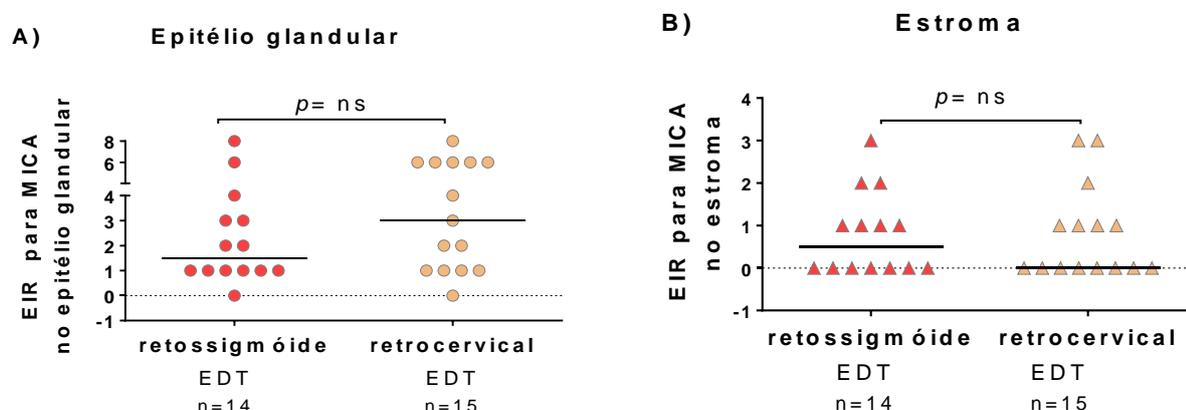
**Figura 20. Escore de imunorreatividade para a expressão da proteína MICA na lesão profunda e no endométrio eutópico de mulheres com EDT em estádios iniciais e avançados da endometriose, e no endométrio eutópico do grupo CTR. A) EIR para MICA no epitélio glandular; B) EIR para MICA no estroma; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; I / II: estádios iniciais da endometriose; III / IV: estádios avançados da endometriose de acordo com a rASRM; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão proteica de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; análise realizada por reação de imunohistoquímica; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

### 4.2.4 Expressão proteica de MICA na lesão profunda de retossigmóide e retrocervical

A expressão de MICA não teve perfil diferencial entre as lesões profundas de retossigmóide ( $n=15$ ) e retrocervical ( $n=14$ ), tanto no epitélio glandular como no estroma, (epitélio glandular: EDT retossigmóide vs retrocervical,  $p= 0,2760$ ; estroma: EDT retossigmóide vs retrocervical,  $p= 0,9578$ ) (Figura 21). A estatística descritiva total (média e mediana) dos escores representativos, de acordo com a localização da doença profunda, está apresentada no Anexo VIII, Tabela 2D.

Considerando o todos os dados de expressão proteica de MICA nos grupos EDT e CTR, incluindo os parâmetros fase do ciclo menstrual, estádios e tipo de lesão profunda, podemos resumir que a expressão proteica de MICA foi maior no epitélio glandular, em ambos os grupos, tanto no endométrio eutópico (EDT e CTR) como na lesão profunda de EDT. No entanto, as principais diferenças entre os grupos foram: **i)** maior frequência de alta expressão de MICA em epitélio glandular do endométrio eutópico do grupo EDT; **ii)** maior expressão de

MICA no epitélio glandular do endométrio de mulheres do grupo CTR, na fase secretora do ciclo menstrual; **iii**) maior expressão de MICA no estroma do endométrio de mulheres do grupo CTR, na fase proliferativa do ciclo menstrual; essas diferenças (**ii** e **iii**) são perdidas no grupo EDT.



**Figura 21. Escore de imunorreatividade para a expressão da proteína MICA em lesões profundas de endometriose retossigmóide e retrocervical. A)** epitélio glandular; **B)** estroma; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore de intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; análise realizada por imunohistoquímica; as barras horizontais representam a mediana do EIS; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

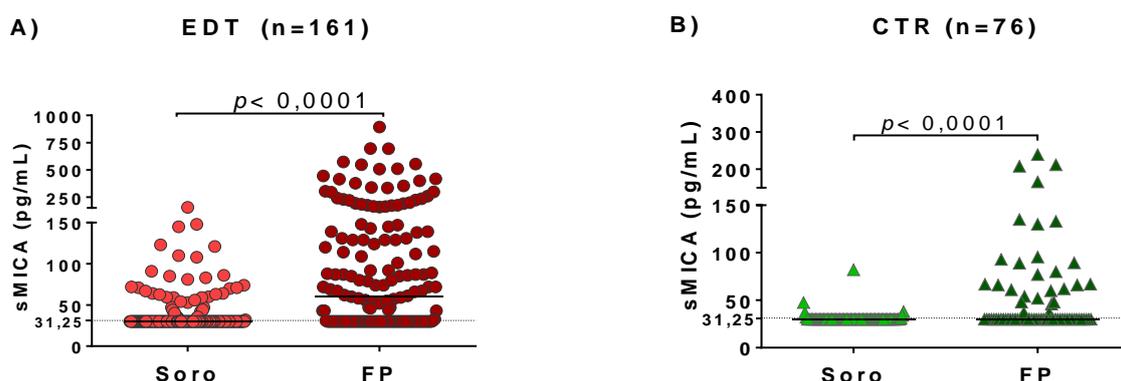
### 4.3 Pesquisa de MICA solúvel

A pesquisa de MICA solúvel (sMICA) foi realizada por ELISA, no soro e no FP, de 161 mulheres com EDT (média etária de 34,85 anos  $\pm$  6,29) e de 76 mulheres CTRs saudáveis (média etária de 35,48 anos  $\pm$  6,73). O grupo CTR foi composto de 50 mulheres submetidas à laparoscopia para laqueadura tubária (LAQ) e por 26 mulheres submetidas à videolaparoscopia, por presença de doença ginecológica não inflamatória (DNI) ou para laparoscopia diagnóstica (descrito no item 3.1), mas sem EDT. Para as análises estatísticas, os valores abaixo do limite de detecção (31,25pg/mL), foram uniformizados como 30pg/mL e, descritos, ao longo dos resultados, como  $< 31,25\text{pg/mL}$ .

Com o objetivo de avaliar a homogeneidade do grupo CTR, foi realizada, inicialmente, uma análise estatística entre os dois “subgrupos” de CTRs (LAQ e DNI), não tendo sido observadas diferenças entre os mesmos (soro e FP,  $p \geq 0,05$ , Teste de *Mann-Whitney*), confirmando tratar-se de um grupo CTR homogêneo e válido considerá-lo conjuntamente para o presente estudo (Anexo IX, Figura 1).

### 4.3.1 Níveis de sMICA no soro e fluido peritoneal em mulheres com endometriose e controles

Os níveis de sMICA identificados nas mulheres com EDT foram maiores no FP (mediana 60, 30–893 min-max) em comparação aos níveis séricos (mediana < 31,25; < 31,25-55 min-max;  $p < 0,0001$ ). Esta mesma diferença foi observada no grupo CTR (FP, mediana < 31,25, < 31,25–239 min-max; soro, mediana < 31,25, < 31,25-82 min-max,  $p < 0,0001$ ) (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*) (Figura 22 e Tabela 3).



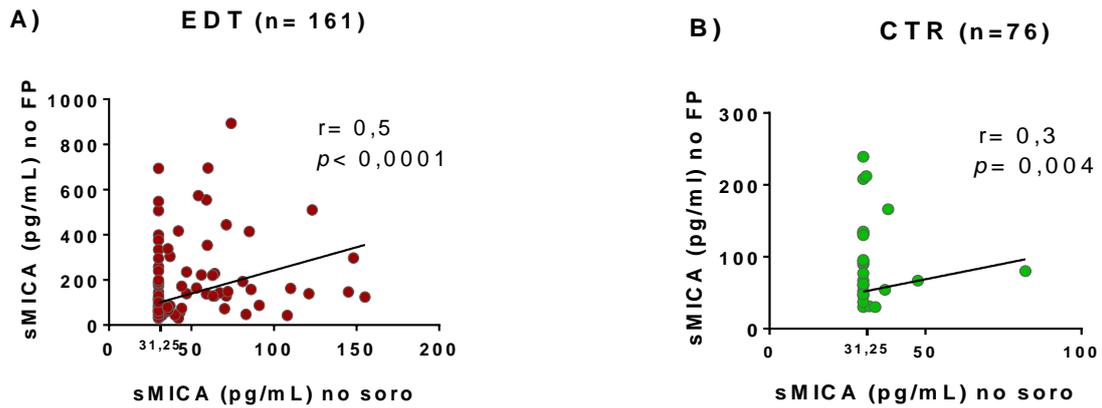
**Figura 22.** Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL) no soro e fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose (EDT) e controles (CTR). A) níveis de sMICA em mulheres com EDT; B) níveis de sMICA em mulheres CTR; ensaio realizado por ELISA; a linha tracejada representa o limite inferior de detecção do teste (31,25pg/mL); as barras horizontais representam a mediana; valores de  $p$  determinados pelo teste *Mann-Whitney*.

**Tabela 3.** Níveis de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles.

	sMICA (pg/mL)		$p$
	Média ( $\pm$ DP)	Mediana (min-max)	
<b>CTR (n=76)</b>			
Soro	<31,25 ( $\pm$ 6,36)	<31,25 (<31,25-82,0)	<0,0001
FP	52,48 ( $\pm$ 44,79)	<31,25 (<31,25-239,0)	
<b>EDT (n=161)</b>			
Soro	46,56 ( $\pm$ 23,86)	<31,25 (<31,25-155,0)	<0,0001
FP	120,50 ( $\pm$ 149,40)	60 (<31,25-893,0)	

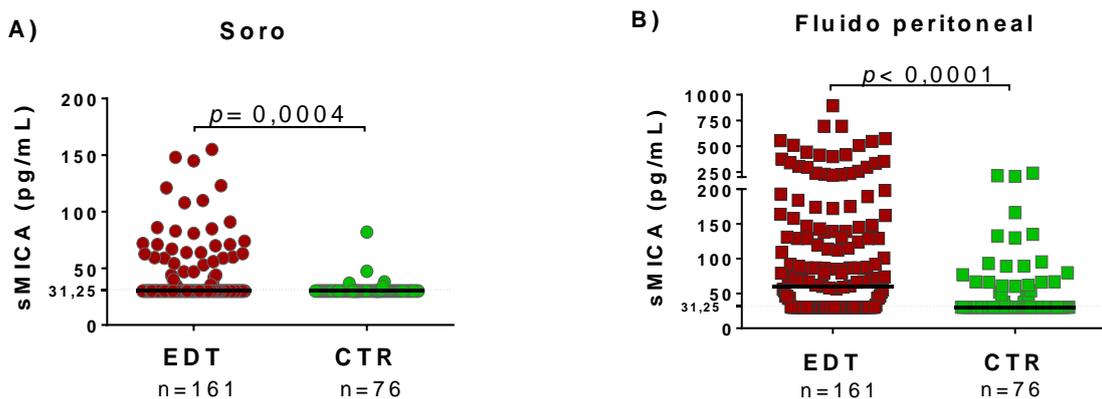
EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; FP: fluido peritoneal; DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; n: número de amostras analisadas em cada grupo; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Foi observada correlação positiva entre os níveis de sMICA, no soro e no FP, em ambos os grupos (EDT,  $r = 0,5$ ,  $p < 0,0001$ ; CTR,  $r = 0,3$ ,  $p = 0,004$ ; teste de correlação de *Spearman*) (Figura 23).



**Figura 23. Análise de correlação entre os níveis de sMICA no soro e no fluido peritoneal (FP), em mulheres com endometriose (EDT) e controles (CTR).** A) mulheres com EDT; B) mulheres CTR; ensaio realizado por ELISA; o limite mínimo de detecção do teste foi de 31,25pg/mL; valores de  $r$  e  $p$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

Os níveis de sMICA foram maiores na EDT do que no grupo CTR, tanto no soro ( $p = 0,0004$ ) como no FP ( $p < 0,0001$ ) (Teste de *Mann-Whitney*) (Figura 24).



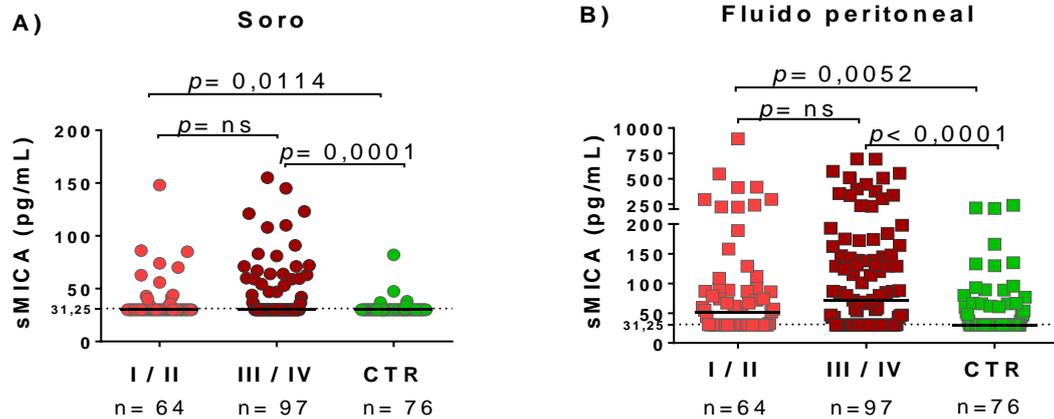
**Figura 24. Distribuição dos níveis de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles.** EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; **A)** níveis de sMICA no soro; **B)** níveis de sMICA no fluido peritoneal; ensaio realizado por ELISA; a linha tracejada representa o limite mínimo de detecção do teste (31,25pg/mL); as barras horizontais representam a mediana; valores de  $p$  determinados pelo teste *Mann-Whitney*.

#### 4.3.2 Níveis de sMICA nos diferentes estádios da endometriose

Os níveis de sMICA, no soro e FP, foram comparados entre mulheres em estádios iniciais (I/II,  $n=64$ ) e avançados (III/IV,  $n=97$ ) da EDT, e desses em relação ao grupo CTR ( $n=76$ ).

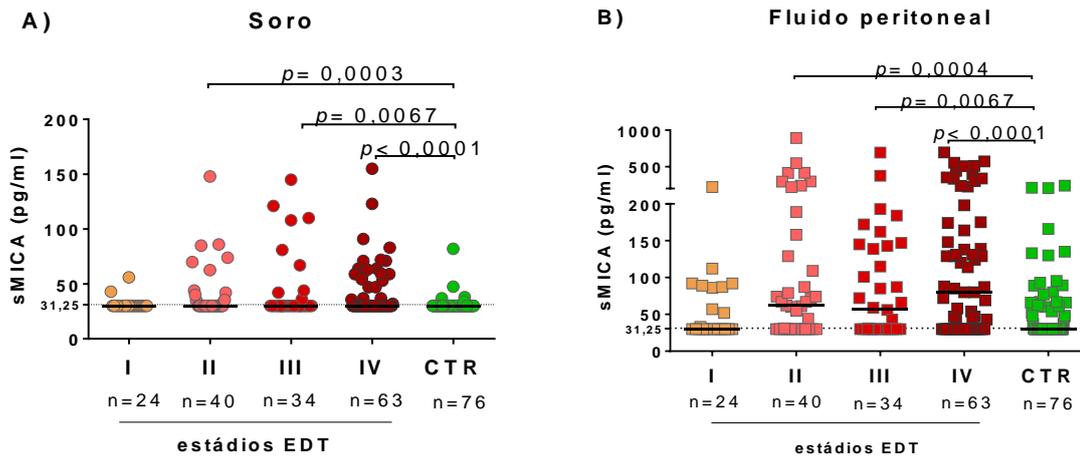
Análise geral entre os 3 grupos (CTR, EDT I/II e EDT III/IV) mostrou diferenças nos níveis de sMICA entre eles, tanto no soro ( $p = 0,0006$ ) como no FP ( $p < 0,0001$ ) (teste de *Kruskal-Wallis*). Na análise comparativa entre 2 grupos, não houve diferença nos níveis de sMICA entre estádios iniciais e avançados da doença ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 25) (soro e FP). Porém,

tanto mulheres em estádios iniciais como em estádios avançados apresentaram níveis de sMICA maiores do que CTRs saudáveis (soro e FP) (EDT inicial vs CTR: soro,  $p= 0,0114$ ; FP,  $p= 0,0052$ ) (EDT avançada vs CTR: soro,  $p= 0,0001$ ; FP,  $p< 0,0001$ ) (teste de *Mann-Whitney*) (Figura 25). Valores de média e mediana dos grupos analisados estão apresentados no Anexo IX, Tabela 1.



**Figura 25. Comparação dos níveis MICA solúvel entre mulheres em estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) da endometriose e controles, no soro e no fluido peritoneal. A) níveis de sMICA no soro; B) níveis de sMICA no FP; ensaio realizado por ELISA; sMICA: MICA solúvel; CTR: grupo controle; FP: fluido peritoneal; linha tracejada: limite inferior de detecção do teste (31,25pg/mL); estádios de acordo com a rASRM; as barras horizontais representam a mediana; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*; ns: não significativa.**

A comparação dos níveis de sMICA entre os quatro diferentes estádios da EDT (I,  $n=24$ ; II,  $n=40$ ; III,  $n=34$ ; IV,  $n=63$ ) e o grupo CTR também mostrou diferença significativa, tanto no soro como no FP ( $p = 0,0004$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente; Teste de *Kruskal-Wallis*). No entanto, observamos que mulheres em estádios II, III e IV mostraram níveis mais elevados de sMICA (soro e FP), em relação ao grupo CTR ( $p < 0,05$ ) (Figura 26) e mulheres em estágio inicial mínimo (I) tiveram níveis de sMICA sem diferença estatística em relação àqueles do grupo CTR (soro e FP;  $p \geq 0,05$ ) (Figura 26) (teste de *Mann-Whitney*).



**Figura 26. Níveis de MICA solúvel, no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose em diferentes estádios da endometriose e em controles. A)** níveis de sMICA no soro; **B)** níveis de sMICA no fluido peritoneal; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; I: EDT inicial, mínima; II, EDT inicial, leve; III: EDT avançada, moderada; IV: EDT avançada, grave - estádios de acordo com a rASRM; ensaio realizado por ELISA; linha tracejada: limite inferior de detecção do teste (31,25pg/mL), as barras horizontais representam a mediana; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

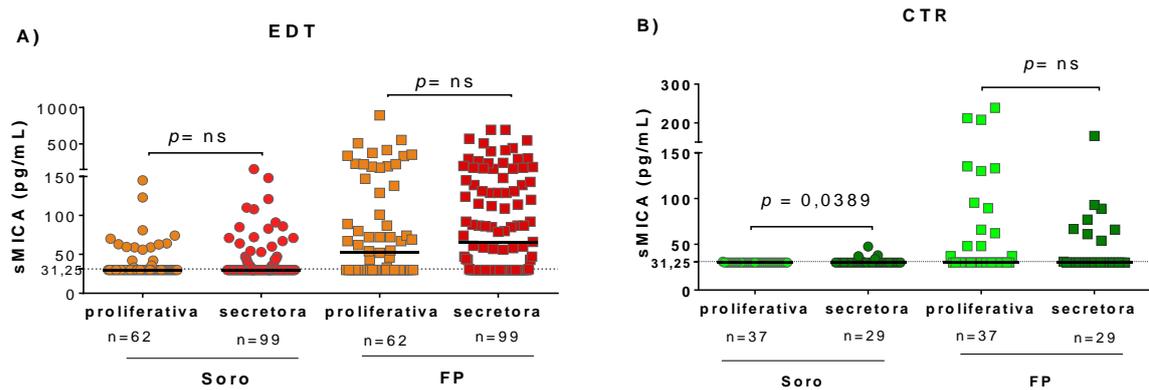
#### 4.3.3 Níveis de sMICA nas diferentes fases do ciclo menstrual

No grupo EDT, 62 mulheres estavam na fase proliferativa e 99 na secretora do ciclo menstrual. No grupo CTR, 37 mulheres estavam em fase proliferativa e 29 na secretora; para 10 mulheres não foi possível obter a informação.

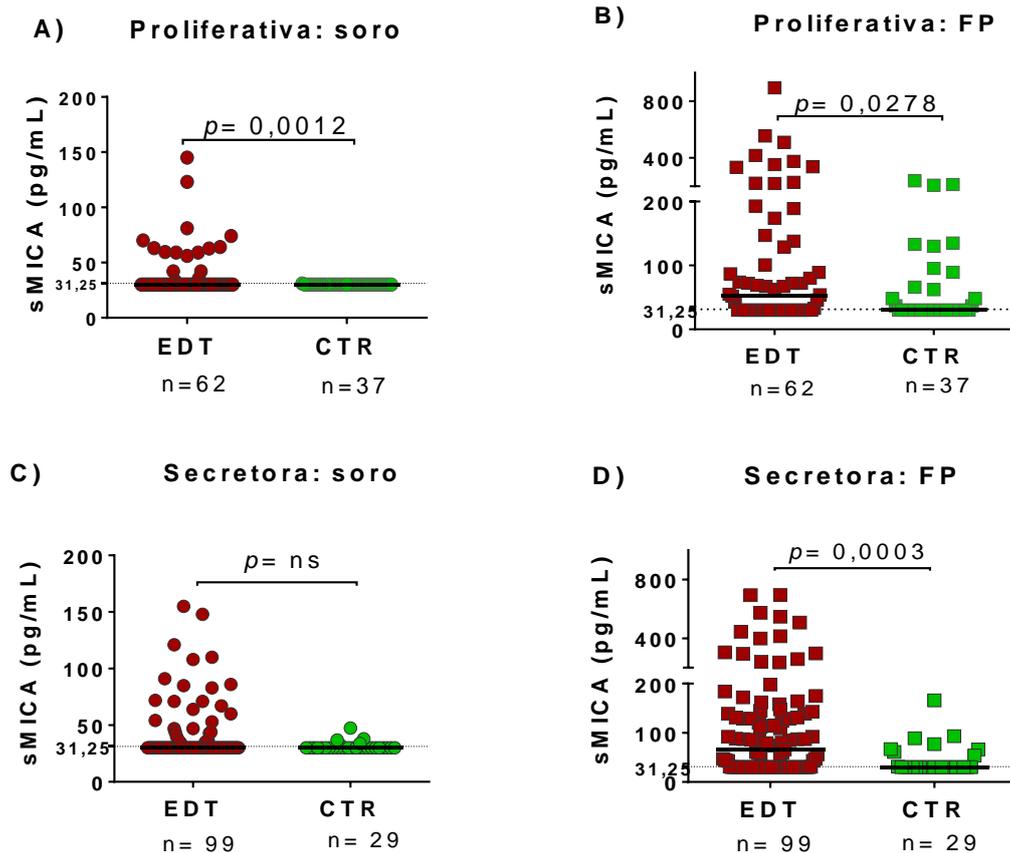
No **grupo CTR**, foram observados níveis de **sMICA maiores no soro, na fase secretora** (progestacional) do ciclo, em relação à fase proliferativa ( $p= 0,0389$ ). No **FP, não foram observadas diferenças** entre as diferentes fases do ciclo menstrual ( $p= 0,4522$ ) (Figura 27). Os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

No **grupo EDT, não foram observadas diferenças** nos níveis de sMICA **entre as diferentes fases do ciclo** menstrual, tanto no soro ( $p= 0,7472$ ) como no FP ( $p= 0,4053$ ), sendo mantidos os maiores níveis no FP (Figura 27).

Na análise comparativa dos níveis de sMICA entre os grupos, observamos os maiores níveis de sMICA no FP do grupo EDT, independentemente da fase do ciclo (Proliferativa: FP, EDT vs CTR,  $p= 0,0278$ ; Secretora: FP, EDT vs CTR,  $p= 0,0003$ ). No entanto, no soro, os maiores níveis de sMICA, em relação ao grupo CTR ocorreu na fase proliferativa (estrogênica) do ciclo, (Proliferativa: soro, EDT vs CTR,  $p= 0,0012$ ; Secretora: Soro, EDT vs CTR,  $p= 0,1056$ , ns) (Figura 28) (teste de *Mann-Whitney*).



**Figura 27. Distribuição dos níveis de MICA solúvel, no soro e fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose e de controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual. A)** níveis de sMICA em mulheres com EDT; **B)** níveis de sMICA no grupo CTR; fase proliferativa: 1<sup>o</sup>– 14<sup>o</sup> dia do ciclo; fase secretora: 15<sup>o</sup> – 30<sup>o</sup> dia do ciclo; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; análise realizada por ELISA; a linha tracejada indica o limite inferior de detecção do teste (31,25pg/mL); as barras horizontais representam as medianas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valor de  $p$  determinado teste de *Mann–Whitney*.



**Figura 28. Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL), no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose e de controles saudáveis, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual. A) e B)** níveis de sMICA na fase proliferativa do ciclo, no soro e FP, respectivamente; **C) e D)** níveis de sMICA na fase secretora do ciclo, no soro e FP, respectivamente; fase proliferativa: 1<sup>o</sup> - 14<sup>o</sup> dia do ciclo; fase secretora: 15<sup>o</sup> - 30<sup>o</sup> dia do ciclo; ensaio realizado por ELISA; sMICA: MICA solúvel, FP, fluido peritoneal; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; a linha tracejada indica o limite de detecção do teste (31,25pg/mL); as barras horizontais representam as medianas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann–Whitney*.

#### 4.3.4 Níveis de sMICA em relação aos tipos de endometriose

Os níveis de sMICA (soro e FP) foram analisados de acordo com os tipos de endometriose. Com base nesse parâmetro, as mulheres foram agrupadas em: EDT peritoneal sem outros locais de acometimento (SUP, n=13), EDT ovariana, com ou sem doença peritoneal e sem EDT profunda (OVA, n=11), EDT profunda, com ou sem doença peritoneal e sem doença ovariana (PROF, n=99) e PROF na presença de OVA (PROF + OVA, n=38).

Na comparação entre o grupo EDT e o grupo CTR, foram observadas diversas diferenças nos níveis de sMICA, tanto no soro como no FP (Figura 29). Os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Soro: maiores níveis em: OVA ( $p= 0,0041$ ), PROF ( $p= 0,0033$ ) e PROF +OVA ( $p< 0,0001$ ), comparativamente ao grupo CTR

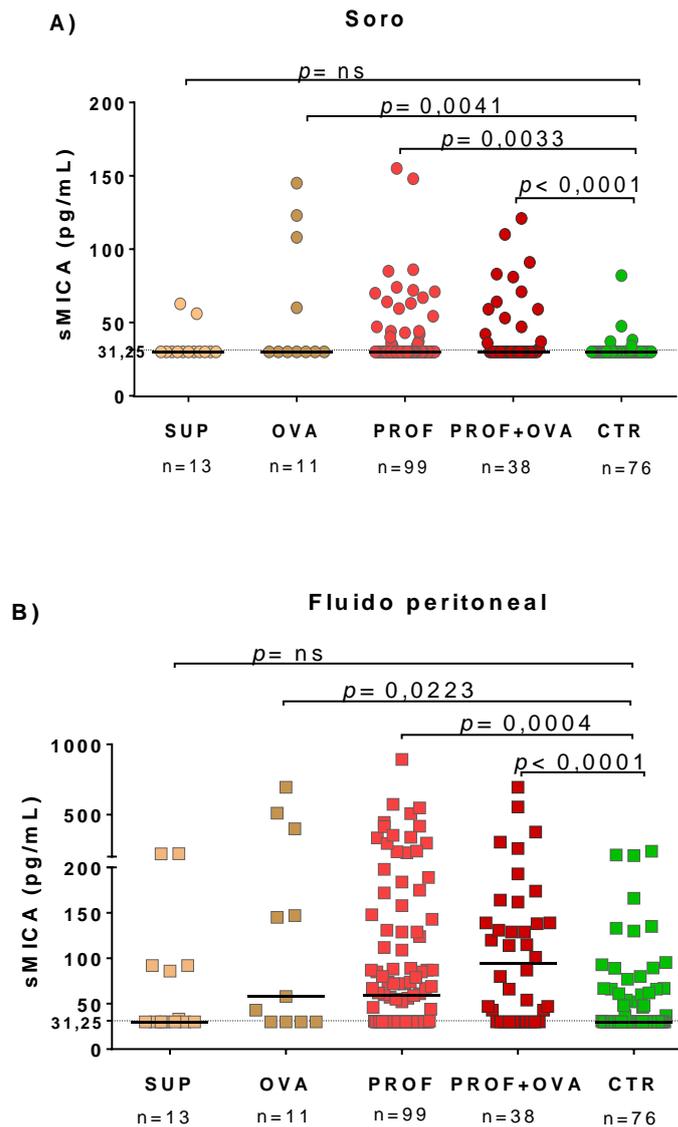
FP: maiores níveis em: OVA ( $p= 0,0223$ ), PROF ( $p= 0,0004$ ) e PROF +OVA ( $p< 0,0001$ ), comparativamente ao grupo CTR

Destacamos que os níveis mais elevados foram observados na presença de doença profunda (PROF e PROF+OVA). No entanto, devemos considerar que a presença de doença profunda foi mais frequente do que as demais formas e, a maior parte das mulheres (97/161, 60,2%) apresentava estágio mais grave da doença (III/IV), onde ocorreu maior frequência de doença profunda, conforme apresentado na Tabela 4. Não foi observada diferença entre os níveis de sMICA (soro e FP) entre mulheres com doença SUP e mulheres do grupo CTR ( $p\geq 0,05$ ) (Figura 29).

**Tabela 4.** Distribuição das lesões de endometriose segundo os tipos e estádios da endometriose

Tipos EDT	Estádios	
	I/II n (%)	III/IV n (%)
SUP	13 (8,1)	NA
OVA	0 (0,0)	11 (6,8)
PROF	50 (31,1)	49 (30,4)
PROF+OVA	1 (0,6)	37 (23,0)
<b>Total</b>	<b>64 (39,8)</b>	<b>97 (60,2)</b>

EDT: endometriose; SUP: lesão superficial; OVA: EDT ovariana, com ou sem doença peritoneal e sem EDT profunda; PROF: EDT profunda com ou sem EDT peritoneal e sem EDT ovariana; OVA+PROF: PROF na presença de OVA; NA: não se aplica devido à ausência de casos nesta condição; I/II: estádios iniciais (mínimo/leve) da endometriose; III/IV: estádios avançados (moderado/grave) da endometriose, de acordo com a rASRM; n: número de amostras analisadas em cada grupo.

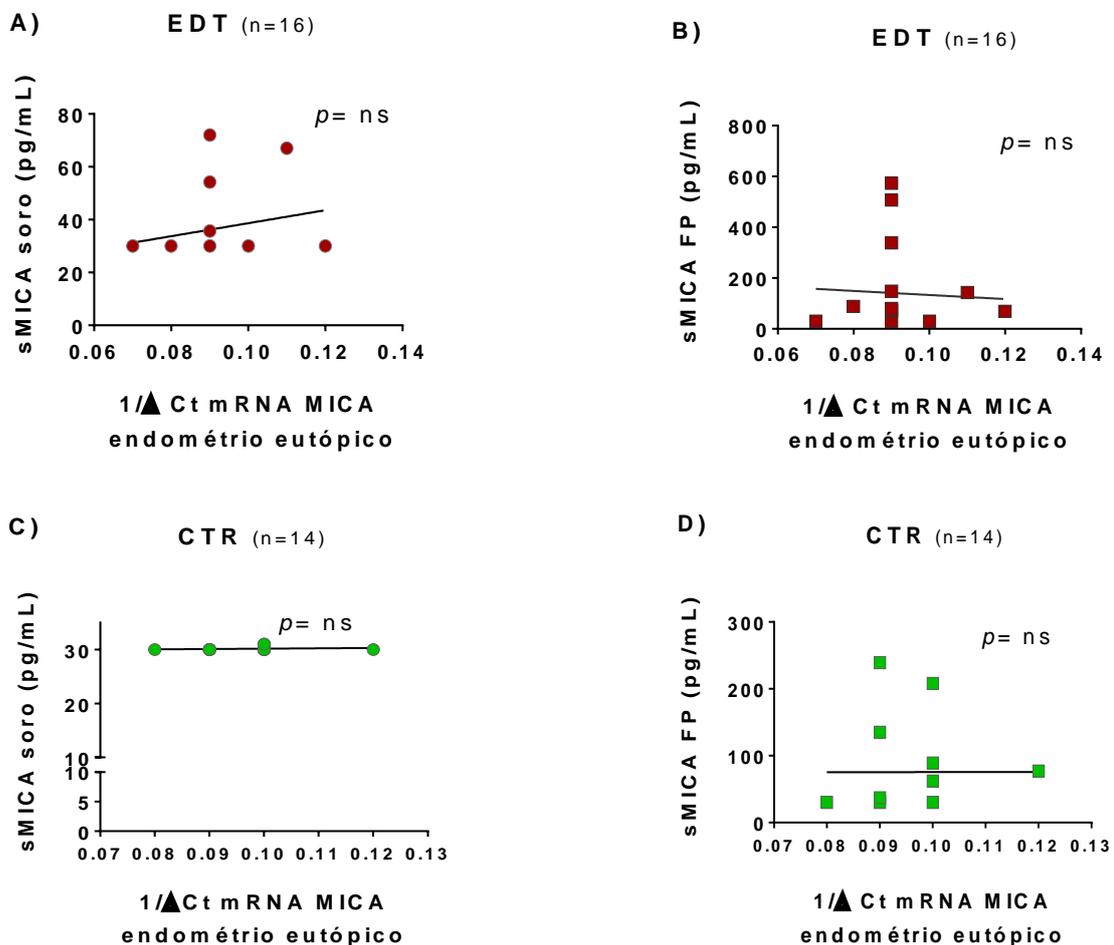


**Figura 29. Distribuição dos níveis de sMICA (pg/mL) no soro e no FP de mulheres com endometriose de acordo com o local de acometimento da doença, e no grupo controle.** EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; SUP: EDT superficial; OVA: EDT ovariana; PROF: EDT profunda; PROF+OVA: EDT profunda na presença de EDT ovariana; ensaio realizado por ELISA; a linha tracejada indica o limite inferior de detecção do teste (31,25pg/mL); as barras horizontais representam as medianas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Os valores das concentrações de sMICA (soro e FP) e os dados clínicos individualizados de ambos os grupos estudados estão apresentados no Anexo IX, Tabela 2. No Anexo IX, Tabela 3, estão apresentadas as concentrações (média e mediana) de sMICA no soro e fluido peritoneal, de acordo com a fase do ciclo menstrual (3A), estágio e tipos de endometriose (3B).

#### 4.3.5 Níveis de sMICA e expressão gênica de *MICA*

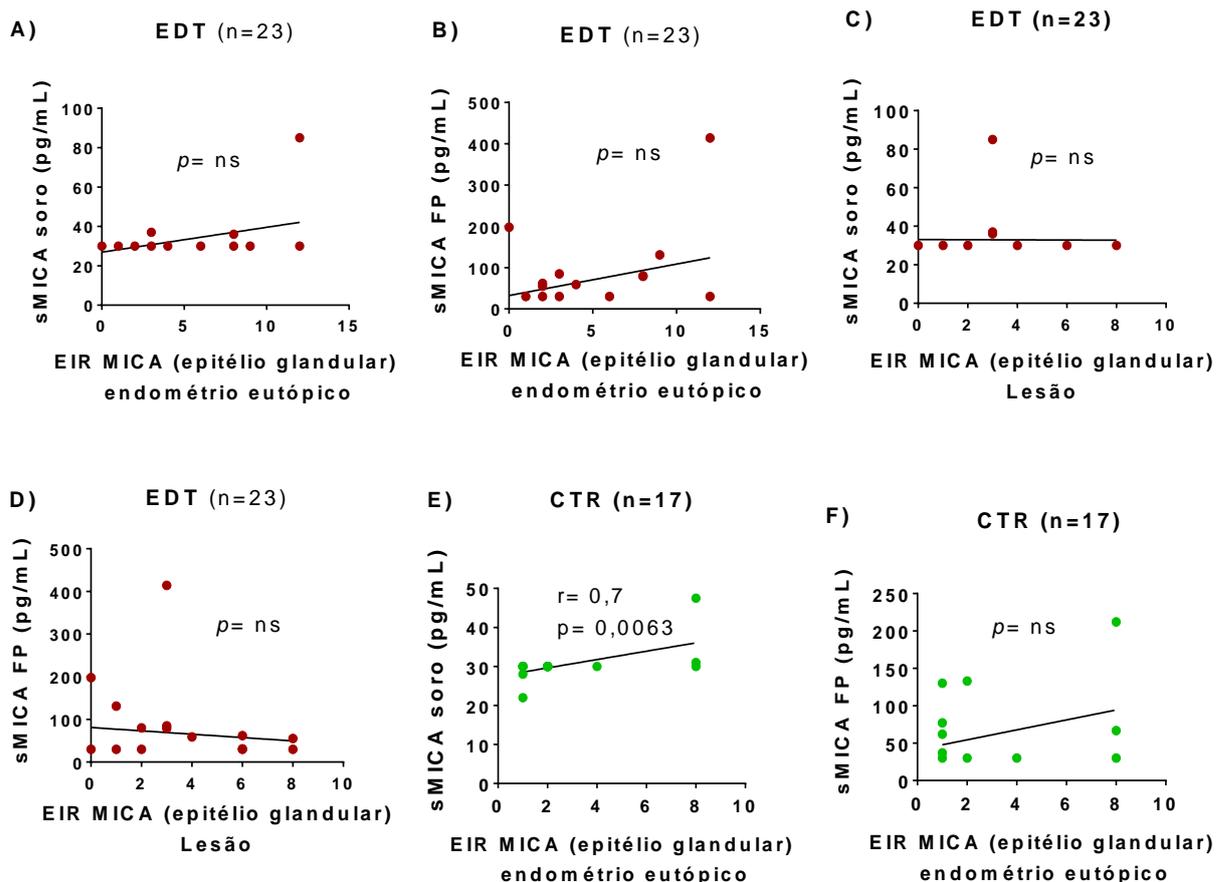
Analizamos a ocorrência, ou não, de correlação entre os níveis de sMICA (soro e FP) e a expressão do gene *MICA*. No grupo EDT, das 24 mulheres avaliadas para expressão de mRNA de *MICA* (Resultados, Item 4.2), 16 também foram avaliadas para os níveis de sMICA. No grupo CTR, 14/23 foram avaliadas também para os níveis de sMICA (soro e FP). No entanto, em ambos os grupos não observamos correlação ( $p \geq 0,05$ , teste de correlação de *Spearman*) (Figura 30). A análise da expressão do gene *MICA* em relação aos estádios da doença não foi realizada, pois a maior parte de mulheres (23/24, 95,8%) estava em estágio avançado da doença (III e IV).



**Figura 30. Análises de correlação entre os valores de  $1/\Delta Ct$  para mRNA de *MICA* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e os níveis de *MICA* solúvel. A)  $1/\Delta Ct$  no endométrio EDT vs sMICA no soro; B)  $1/\Delta Ct$  no endométrio EDT vs sMICA no FP; C)  $1/\Delta Ct$  no endométrio CTR vs sMICA no soro; D)  $1/\Delta Ct$  no endométrio CTR vs sMICA no FP; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; FP: fluido peritoneal; sMICA: *MICA* solúvel; níveis de sMICA determinados por ELISA;  $\Delta Ct$ : diferença entre a expressão do gene alvo, *MICA*, e o gene normalizador endógeno,  $\beta$ -Actina; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.**

#### 4.3.6 Análise de correlação entre os níveis de sMICA e a expressão de MICA *in situ*

A análise de correlação entre a expressão proteica *in-situ* de MICA (lesão e endométrio eutópico do grupo EDT, e endométrio eutópico do grupo CTR) e os níveis de sMICA (soro e FP) foi realizada em 23 mulheres do grupo EDT e em 17 mulheres do grupo CTR, considerando-se os EIRs em glândula e estroma. Não foi observada correlação entre os níveis de sMICA, tanto do soro, como do FP, e a expressão proteica *in-situ* de MICA na lesão e no endométrio eutópico de mulheres com EDT, tanto em glândula como em estroma. No entanto, foi observada correlação positiva entre os níveis de sMICA no soro de mulheres CTR e a expressão de MICA no epitélio glandular ( $r = 0,7$ ,  $p = 0,0063$ ; teste de correlação de *Spearman*) (Figura 31). Não foi observada correlação entre sMICA no FP e expressão de MICA em epitélio glandular, nem entre os níveis de sMICA, tanto do soro, como do FP, e a expressão proteica *in-situ* de MICA no estroma. Na Figura 31 estão apresentados alguns exemplos de análise de correlação (análise de correlação de *Spearman*).



**Figura 31. Análise de correlação entre os níveis de sMICA, no soro e no fluido peritoneal, e a expressão proteica *in situ* de MICA em epitélio glandular. A), C) e E) níveis sMICA no soro e EIR MICA; B) D) e F) níveis sMICA no fluido peritoneal (FP) e EIS MICA; níveis de sMICA avaliados por ensaio de ELISA; análise de expressão *in situ* da proteína MICA realizada por imunohistoquímica; EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore de intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; sMICA: MICA solúvel; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle, valores de  $r$  e  $p$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.**

### 4.3.7 Pesquisa de nível de sMICA como potencial parâmetro preditivo para a endometriose.

A análise da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic Curve*) foi realizada com objetivo de identificar a sensibilidade e especificidade dos níveis de sMICA, no soro e no fluido peritoneal, de forma a identificar um possível valor de corte para discriminar mulheres com EDT e mulheres CTRs, sem a doença (capacidade preditiva).

De forma geral, os valores da AUC são interpretados como: excelente ( $> 0,9$ ), bom ( $0,8-0,9$ ), fraco ( $0,7-0,80$ ), pobre ( $0,6-0,7$ ) e não discriminatório ( $0,5-0,6$ ) (Tape, 2015).

Criamos curvas ROC para níveis de sMICA no soro e FP, para os subgrupos: 1) grupo total de mulheres com EDT, 2) mulheres com EDT inicial (I/II) e avançada (III/IV), 3) mulheres com EDT em estádios de I a IV.

No grupo total de mulheres com EDT, não foram encontrados valores que pudessem discriminar, adequadamente, doentes e não doentes, nem no soro nem FP. No soro, a AUC foi de 0,604 (IC 95%, 0,53-0,68) e para o FP de 0,660 (IC 95%, 0,59-0,73). A análise da curva ROC para estádios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) também não indicou valores de AUC discriminatórios para mulheres com EDT [estádios iniciais, soro: AUC de 0,578 (IC 95%, 0,48-0,68); FP: AUC 0,619 (IC 95%, 0,52-0,71); estádios avançados, soro: AUC de 0,623 (IC 95%, 0,54-0,71); FP: AUC de 0,684 (IC 95%, 0,61-0,76)].

Na avaliação da curva ROC para níveis de sMICA no FP, apenas em mulheres com EDT em estágio IV, o mais grave da doença, observamos valor discriminatório fraco de nível de sMICA. O valor de corte para níveis de sMICA no FP foi de 40pg/mL, com 67% de sensibilidade e 67% especificidade (33% de casos falso positivos), e uma AUC de 0,704 (IC 95%, 0,61-0,79). Para sMICA no soro, no estágio IV, tivemos: valor de corte= 34,8pg/mL, sensibilidade= 33% e especificidade= 95% (5% de falsos positivos), AUC: 0,638 (IC 95%: 0,54-0,73). Os valores de corte, AUC, sensibilidade e especificidade de todos os subgrupos analisados (total de mulheres com EDT, estádios iniciais e avançados, e estádios I a IV da EDT e a representação gráfica das curvas ROC para níveis de sMICA no soro e no FP de mulheres com EDT em estágio IV estão apresentados no Anexo IX (Tabela 4 e Figura 2, respectivamente).

## 4.4 Células NK e subpopulações: análises quantitativas e funcionais

Com o objetivo de avaliar a atividade efetora de células NK na EDT, quantificamos as subpopulações de células NK e expressão do receptor NKG2D e das moléculas IFN- $\gamma$  e IL-10. Analisamos também a expressão de moléculas envolvidas na ativação de células NK, CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, frente ao estímulo com as células K562 e células K562 células

bloqueadas para a proteína MICA (K562BLOQ), em células NK totais e suas subpopulações, bem como a capacidade citotóxica de células NK, frente aos mesmos estímulos.

#### 4.4.1 Análise quantitativa das subpopulações de células NK e expressão de NKG2D, IFN- $\gamma$ e IL-10

A quantificação de subpopulações de células NK nos grupos EDT e CTR foi realizada por citometria de fluxo, na condição *ex vivo* e na condição basal de cultura (6h de cultura). Avaliamos a porcentagem (%) de diferentes subpopulações de NK com expressão das moléculas NKG2D, IFN- $\gamma$  e IL-10, assim como a intensidade de expressão (mediana de intensidade de fluorescência, MFI) dessas moléculas nas subpopulações de NK.

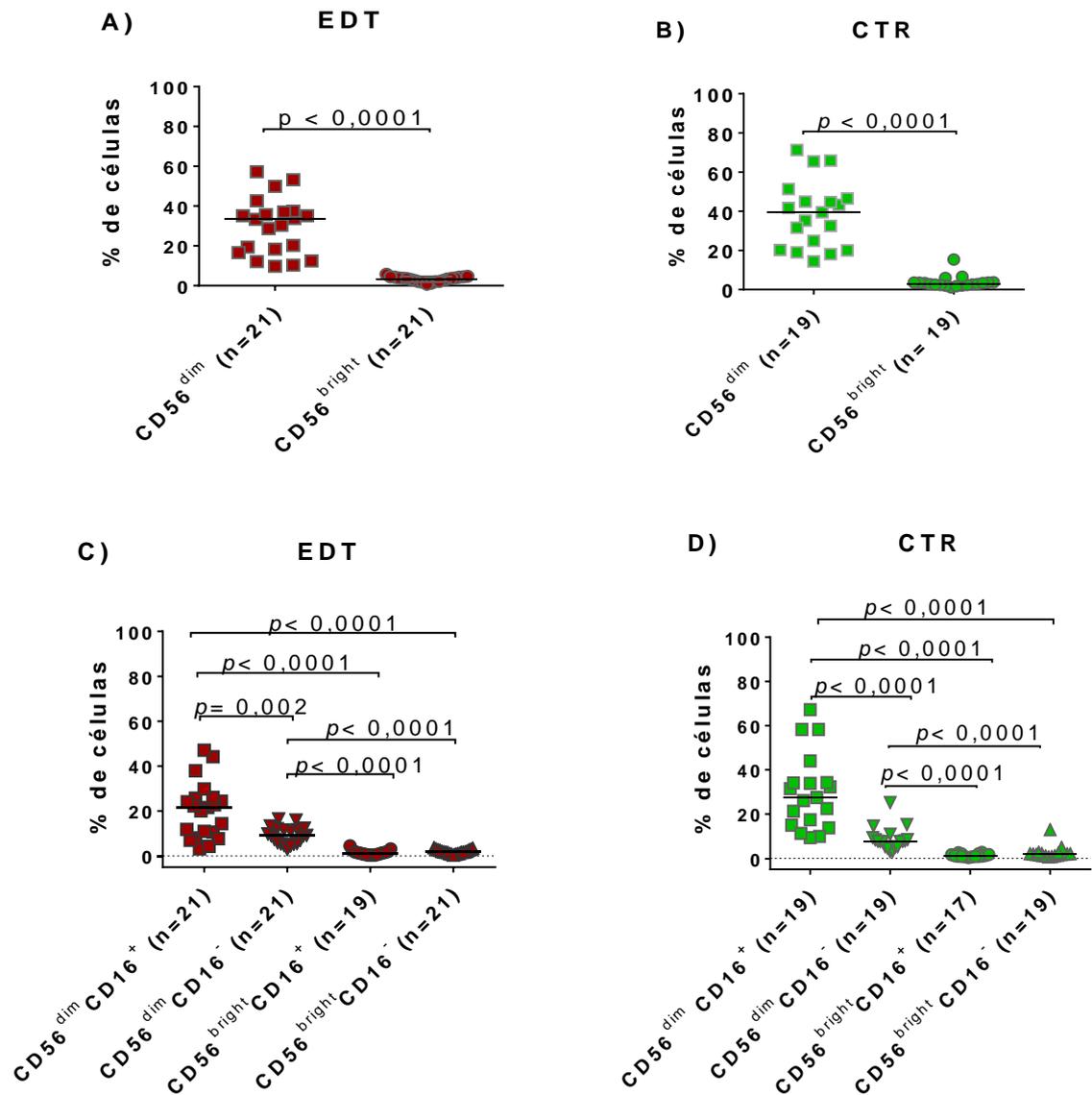
##### 4.4.1.1 Subpopulações NK: na condição *ex vivo*

Como condição *ex vivo*, consideramos amostras de PBMC após o descongelamento celular e descanso por 1-1:30h, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio R10 (Métodos, item 3.9.1).

Para cada participante da pesquisa foram analisadas as% das subpopulações CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, e das subpopulações CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>. Para as comparações dos grupos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*.

- ▶ **Grupo CTR**: observamos maior frequência das subpopulações CD56<sup>dim</sup> (Figura 32):
  - CD56<sup>dim</sup> vs CD56<sup>bright</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ )
  
- ▶ **Grupo EDT**: de forma semelhante ao encontrado no grupo saudável, encontramos maior frequência das subpopulações CD56<sup>dim</sup> (Figura 32):
  - CD56<sup>dim</sup> vs CD56<sup>bright</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p = 0,002$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p < 0,0001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> vs CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ )

Assim, as proporções entre as diferentes subpopulações de NK estão preservadas na EDT.



**Figura 32. Porcentagem das subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, na condição *ex vivo*. A) e C) grupo endometriose (EDT); B) e D) grupo controle (CTR); Linha pontilhada: indica o valor de zero de % de células; as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão em cada subpopulação de células NK, valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

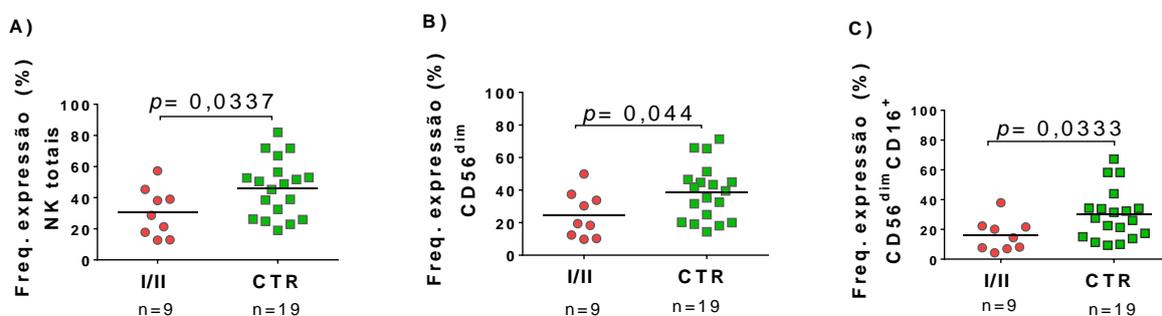
► **Grupo EDT vs grupo CTR:** as subpopulações de NK tiveram porcentagens semelhantes entre os grupos, exceto para a subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, descrita como citotóxica (27,5% vs 21,6%;  $p = 0,0456$ , teste T não pareado) que teve menor frequência no grupo EDT (Tabela 5).

**Tabela 5.** Medianas das frequências de subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, **na condição ex vivo.**

Subpopulações	EDT mediana		CTR mediana		p
	(n)	(%)	(n)	(%)	
<b>NK totais</b>	21	35,6	19	48,9	0,0553*
<b>CD56<sup>dim</sup></b>	21	33,3	19	39,5	0,1061
<b>CD56<sup>bright</sup></b>	21	3,6	19	2,8	0,4813
<b>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup></b>	21	21,6	19	<b>27,5</b>	<b>0,0456*</b>
<b>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup></b>	21	9,1	19	7,7	0,4364
<b>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup></b>	19	1,3	16	1,0	0,9025
<b>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup></b>	21	1,8	19	1,8	0,9733

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; em negrito: valor de p considerado significativo; em vermelho: maior valor de mediana entre os grupos analisados; valores de p determinados pelo teste de *Mann-Whitney*; \*valores de p determinados pelo teste T não pareado.

A **análise** das subpopulações de célula NK de acordo com a **estratificação por estádios** da EDT, indicou que a menor frequência da subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> observadas na EDT, esteve associada aos estádios iniciais da doença (I/II), na comparação com o grupo CTR saudável (EDT: média 15,9 ± 10,7 vs CTR 29,9 ± 17,2, p= 0,0333, teste T não pareado). Além dessa subpopulação, também foi observado que NK totais (EDT: média 30,3±15,6 vs CTR 46,3±18,4, p= 0,0337, teste T não pareado) e a subpopulação CD56<sup>dim</sup> (EDT: média 24,6 ± 13,9 vs CTR 38,5 ± 17,1, p= 0,044, teste T não pareado) também tiveram menor expressão na EDT inicial (Figura 33). As demais subpopulações não tiveram diferenças tanto em relação à EDT avançada nem em relação ao grupo CTR (p= ns).



**Figura 33.** Comparação entre a frequência de células NK totais (A) e das subpopulações CD56<sup>dim</sup> (B) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (C) entre estádios iniciais (I/II) da endometriose e controles. I/II: estádios iniciais da endometriose de acordo com a rASRM; CTR: grupo controle; as barras horizontais representam a média dos valores; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Freq.; frequência; valores de p determinados pelo teste T não pareado.

#### 4.4.1.2 Expressão de NKG2D em subpopulações NK: na condição *ex vivo*

Também avaliamos a expressão do receptor da proteína MICA, NKG2D, em células NK e em suas subpopulações. Os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney* (Figura 34).

► **Grupo CTR:** maior % de células com expressão de **NKG2D** na subpopulação **CD56<sup>bright</sup>**, descrita como mais produtora de citocina, em relação à subpopulação **CD56<sup>dim</sup>** ( $p=0,0029$ ), descrita com maior propriedade citotóxica. Observamos também (Figura 34, B e D):

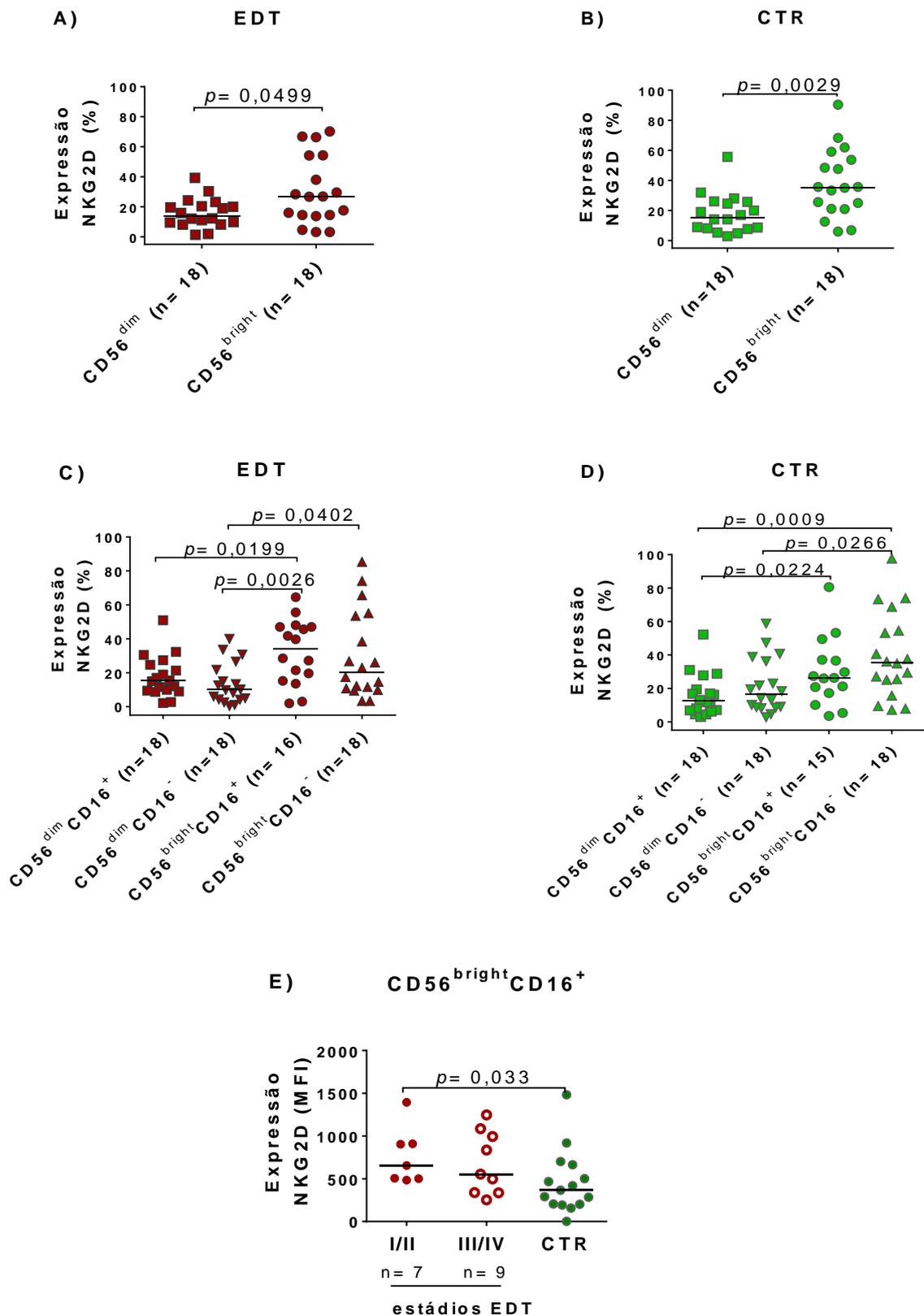
- NKG2D (%):**
- $CD56^{bright}CD16^+ > CD56^{dim}CD16^+$  ( $p=0,0224$ )
  - $CD56^{bright}CD16^- > CD56^{dim}CD16^+$  ( $p=0,0009$ )
  - $CD56^{bright}CD16^- > CD56^{dim}CD16^-$  ( $p=0,0266$ )

► **Grupo EDT:** maior % de células com expressão de **NKG2D** na subpopulação **CD56<sup>bright</sup>** em relação à subpopulação **CD56<sup>dim</sup>** ( $p=0,0499$ ), de forma semelhante ao grupo saudável. Observamos também (Figura 34 A e C):

- NKG2D (%):**
- $CD56^{bright}CD16^+ > CD56^{dim}CD16^+$  ( $p=0,0199$ )
  - $CD56^{bright}CD16^+ > CD56^{dim}CD16^-$  ( $p=0,0026$ ) (não encontrada na EDT)
  - $CD56^{bright}CD16^- > CD56^{dim}CD16^-$  ( $p=0,0402$ )

► **Grupo EDT vs grupo CTR:** Na análise comparativa entre os grupos na condição *ex vivo* não foi observada diferença na % de expressão do receptor NKG2D (Tabela 6). No entanto, houve uma maior intensidade de expressão (MFI) de NKG2D em NK totais ( $p=0,0402$ ) e nas subpopulações **CD56<sup>dim</sup>** ( $p=0,0334$ ) e **CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>** ( $p=0,0221$ ) em mulheres com EDT, em relação aos CTRs saudáveis (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*).

Além disso, a análise estratificada por estágio, indicou que a mediana de intensidade de fluorescência para NKG2D em células **CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>** foi maior em mulheres em estágios iniciais da doença (mediana, 655, min-max, 484-1395), na comparação com o grupo CTR (mediana, 367, min-max, 3-1483;  $p=0,033$ , teste de *Mann-Whitney*) (Figura 34E).



**Figura 34.** Porcentagem (%) de células com expressão de NKG2D nas subpopulações NK circulantes em mulheres com endometriose e controles saudáveis, e expressão de acordo com estádios da doença, na condição *ex vivo*. **A-D)** expressão de NKG2D nas subpopulações NK; **E)** expressão NKG2D, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, entre estádios da EDT e CTR; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; I/II: estádios iniciais da EDT; III/IV: estádios avançados da EDT, de acordo com a rASRM; barras horizontais representam as medianas da % de expressão; valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 6.** Comparação da frequência de células com expressão do receptor NKG2D, e intensidade de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, **na condição *ex vivo***.

Subpopulações	EDT (n)	NKG2D		CTR (n)	NKG2D		$p^*$	$p^\ddagger$
		%	MFI		%	MFI		
NK totais	18	14,4	<b>311,5</b>	18	16,5	185,5	0,6561	<b>0,0402</b>
CD56 <sup>dim</sup>	18	14,1	<b>312,0</b>	18	15,6	191,0	0,8329	<b>0,0334</b>
CD56 <sup>bright</sup>	18	26,8	508,0	18	35,4	503,0	0,3348	0,8945
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	18	15,3	303,0	18	15,3	3,0	0,4863	0,0599
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	10,0	352,5	18	16,4	384,0	0,0986	0,9875
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	34,1	<b>605,0</b>	15	26,3	367,0	0,6187	<b>0,0221</b>
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	20,2	466,5	18	35,5	519,0	0,2262	0,7130

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; %: frequência de expressão, dada em mediana da porcentagem; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; \*valor de  $p$  referente à mediana de porcentagem de expressão entre EDT e CTR; †valor de  $p$  referente à MFI entre EDT e CTR; em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor da maior mediana significativa entre os grupos; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Realizamos também a análise de correlação entre a expressão (frequência, % e intensidade de expressão, MFI) de NKG2D, em células NK, e os níveis de sMICA, no soro e FP. Observamos correlações negativas em relação aos níveis de sMICA no soro, e apenas no grupo EDT. A correlação negativa entre a % e níveis de sMICA foram para as subpopulações: CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0429$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0446$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = -0,6$ ,  $p = 0,0167$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0429$ ). Entre MFI de NKG2D e sMICA no soro, a presença de correlação negativa foi observada para: NK totais ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0467$ ) e para as subpopulações CD56<sup>dim</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0467$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,02$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = -0,6$ ,  $p = 0,0167$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0319$ ) (Correlação de *Spearman*) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de correlação da frequência, e intensidade de expressão, de NKG2D nas subpopulações de células NK, com os níveis de MICA solúvel, no grupo de mulheres com endometriose e controles.

Subpopulações	EDT					EDT				
	(n)	sMICA soro vs		sMICA FP vs		(n)	sMICA soro vs		sMICA FP vs	
		NKG2D (%)	NKG2D (MFI)	NKG2D (%)	NKG2D (MFI)		NKG2D (%)	NKG2D (MFI)		
	r	p	r	p	r	p	r	p	p	
NK totais	18	-0,4	ns	-0,5	<b>0,0467</b>	18	-0,3	ns	-0,4	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	-0,4	ns	-0,5	<b>0,0467</b>	18	-0,2	ns	-0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup>	18	<b>-0,5</b>	<b>0,0446</b>	<b>-0,5</b>	<b>0,0200</b>	18	-0,1	ns	-0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	18	-0,3	ns	-0,1	ns	16	-0,3	ns	-0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	<b>-0,5</b>	<b>0,0429</b>	-0,4	ns	18	-0,4	ns	-0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	<b>-0,6</b>	<b>0,0167</b>	<b>-0,6</b>	<b>0,0167</b>	18	-0,2	ns	-0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	<b>-0,5</b>	<b>0,0429</b>	<b>-0,5</b>	<b>0,0319</b>	18	-0,3	ns	-0,3	ns

Subpopulações	CTR					CTR				
	(n)	sMICA soro vs		sMICA FP vs		(n)	sMICA soro vs		sMICA FP vs	
		NKG2D (%)	NKG2D (MFI)	NKG2D (%)	NKG2D (MFI)		NKG2D (%)	NKG2D (MFI)		
	r	p	r	p	r	p	r	p	p	
NK totais	15	0,2	ns	-0,02	ns	15	0,3	ns	0,2	ns
CD56 <sup>dim</sup>	15	0,2	ns	0,0	ns	15	0,3	ns	0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	0,3	ns	0,2	ns	15	0,1	ns	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	15	0,2	ns	0,2	ns	15	0,3	ns	0,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	0,2	ns	0,2	ns	15	-0,1	ns	-0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	14	0,4	ns	0,1	ns	14	0,5	ns	0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	0,2	ns	0,1	ns	15	-0,01	ns	0,1	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; em negrito: valores de  $p$  considerados significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de  $r$ ; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; ns: não significativa ( $p \geq 0,05$ ), valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

#### 4.4.1.3 Expressão das moléculas IFN- $\gamma$ e IL-10: na condição *ex vivo*

Ainda na condição *ex vivo*, foram analisadas a frequência (%) de células positivas para IFN- $\gamma$  e IL-10, e a intensidade de expressão (MFI) dessas moléculas (Tabela 8). Para as comparações entre os grupos, EDT e CTR, e para a determinação dos respectivos valores de  $p$ , foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

- **IFN- $\gamma$** : observamos maior % de células produtoras de IFN- $\gamma$  em mulheres com EDT, em relação ao grupo CTR, nas subpopulações:

- **% de IFN- $\gamma$** : • CD56<sup>dim</sup>: **EDT > CTR** ( $p = 0,0205$ )

- CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>: **EDT > CTR** ( $p = 0,0271$ )

Não foram observadas diferenças significativas para a intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  ( $p \geq 0,05$ ).

- **IL-10**: não houve diferença na % de células, entre EDT e CTRs saudáveis.

No entanto, encontramos maior intensidade de expressão em mulheres com EDT, em relação ao grupo CTR, em todas as populações analisadas:

- MFI de IL-10:**
- NK totais: EDT > CTR ( $p= 0,0037$ )
  - CD56<sup>dim</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0066$ )
  - CD56<sup>bright</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0003$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0105$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0039$ )
  - CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0061$ )
  - CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>: EDT > CTR ( $p= 0,0025$ )

**Tabela 8. Porcentagem de células com expressão de IFN- $\gamma$  ou IL-10, e intensidades de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles saudáveis, na condição *ex vivo*.**

Subpopulações	IFN- $\gamma$ (% de expressão)							IL-10 (% de expressão)								
	EDT			CTR				$p$	EDT			CTR				$p$
	(n)	med	min-max	(n)	med	min-max	(n)		med	min-max	(n)	med	min-max			
NK totais	21	2,2	0,71-13,6	19	1,8	0,2-7,5	0,0818	21	0,4	0,3-1,9	19	0,5	0,2-1,6	0,6534		
CD56 <sup>dim</sup>	21	<b>2,4</b>	1,0-13,5	19	1,8	0,3-6,5	<b>0,0205</b>	21	0,4	0,1-1,9	19	0,5	0,0-1,7	0,3435		
CD56 <sup>bright</sup>	21	3,3	0,0-8,5	19	1,5	0,3-6,5	0,2055	21	0,4	0,0-1,6	19	0,3	0,4-1,7	0,8775		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	21	<b>2,5</b>	<b>1,2-13,0</b>	<b>19</b>	<b>1,7</b>	0,2-8,1	<b>0,0271</b>	21	0,5	0,1-2,4	19	0,5	0,2-1,5	0,4646		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	21	2,8	0,4-13,1	19	1,7	0,4-7,5	0,2499	21	0,4	0,0-1,9	19	0,6	0,2-1,4	0,1185		
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	19	3,3	0,0-11,5	16	1,1	0,0-15,8	0,0719	19	0,7	0,0-4,4	16	0,4	0,0-1,8	0,0523		
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	21	2,6	0,4-18,6	19	2,4	0,6-11,7	0,7532	21	0,5	0,0-3,6	19	0,3	0,0-2,3	0,8236		

Subpopulações	IFN- $\gamma$ (intensidade de expressão, MFI)							IL-10 (intensidade de expressão, MFI)								
	EDT			CTR				$p$	EDT			CTR				$p$
	(n)	med	min-max	(n)	med	min-max	(n)		med	min-max	(n)	med	min-max			
NK totais	21	49	29-200	19	48	3-168	0,7683	21	<b>145</b>	3-286	19	3	3-249	<b>0,0037</b>		
CD56 <sup>dim</sup>	21	49	29-199	19	48	3-168	0,7529	21	<b>147</b>	3-305	19	3	3-351	<b>0,0066</b>		
CD56 <sup>bright</sup>	21	39	3-207	19	37	3-176	0,5596	21	<b>240</b>	93-429	19	164	56-251	<b>0,0003</b>		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	21	51	29-210	19	66	3-168	0,7631	21	<b>86</b>	3-613	19	3	3-255	<b>0,0105</b>		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	21	49	23-180	19	50	3-177	0,6928	21	<b>189</b>	132-306	19	162	122-197	<b>0,0039</b>		
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	19	45	3-204	16	49	3-184	0,7630	19	<b>207</b>	3-481	16	33	3-306	<b>0,0061</b>		
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	21	37	3-207	19	32	3-169	0,2669	21	<b>241</b>	141-443	19	204	88-236	<b>0,0025</b>		

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; med: mediana; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor da maior mediana significativa entre os grupos analisados; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.4.2 Expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10 frente a estímulo com células K562

A atividade efetora das células NK foi avaliada, tanto em relação à frequência (%) como à intensidade (MFI) de expressão, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, em células NK totais e em suas subpopulações. Avaliamos esses parâmetros frente aos estímulos com as células K562 (K562) e células K562 previamente bloqueadas para a proteína MICA (K562BLOQ). O bloqueio de MICA nas células K562 teve como objetivo representar o potencial efeito da presença de MICA solúvel em inibir a interação com a molécula NKG2D, e medir seu impacto na atividade citotóxica de células NK (Boukouaci *et al.*, 2013; Groh *et al.*, 2002). A magnitude de expressão de tais moléculas foi também avaliada quanto à sua possível associação com estádios da EDT e fases do ciclo menstrual. Como controle de expressão, foi incluída a condição basal de cultura, sem estímulo.

A % de células K562 com expressão de MICA, e sua intensidade de expressão (MFI), foram analisadas em cada experimento de cocultura (PBMC + K562) (Anexo X, Tabela 1). A mediana da frequência de células K562 positivas (avaliada em 11/13 ensaios) para a expressão de MICA foi de 42,2% e, MICA em células K562 bloqueadas (K562BLOQ) foi de 13,1% correspondendo a uma mediana de bloqueio de 63,6%. O bloqueio de MICA afetou menos a sua intensidade de expressão, com mediana de bloqueio de 33,9%.

##### 4.4.2.1 CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10: na condição estado basal de cultura, sem estímulo

No estado basal de cultura (sem estímulo), foram analisadas a frequência e a intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, entre as subpopulações de células NK, nos grupos EDT e CTRs. Os resultados referentes à % de expressão estão apresentados na Figura 35 e, da intensidade de expressão das moléculas, no Anexo X, Tabela 2.

##### ► Grupo CTR:

- **CD107a:** para a expressão de CD107a, no grupo CTR, observamos diferenças significantes, tanto para a % como para a intensidade de expressão, entre várias subpopulações de células NK ( $p < 0,0001$ , teste de *Kruskal-Wallis*). Na comparação entre duas subpopulações celulares (pós teste de *Dunn*), observamos:

- **% de CD107a:**
  - CD56<sup>dim</sup>>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>> CD56<sup>bright</sup> ( $p < 0,001$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>> CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ )

- $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $p < 0,001$ )
- MFI de CD107a:**
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{+} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,001$ )
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD16^{-}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{+} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,001$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{+} > CD56^{dim}CD16^{-}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{-}$  ( $p < 0,05$ )

De forma geral, observamos que a maior frequência para CD107a esteve associada às células  $CD56^{dim}$  e, de maior intensidade de expressão, às células  $CD56^{bright}$ .

- **IFN- $\gamma$** : não observamos diferença, tanto para a % ( $p = 0,0746$ ) como para a intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  ( $p = 0,3973$  (teste de *Kruskal-Wallis*), entre as subpopulações NK.

- **IL-10**: observamos diferença entre as subpopulações de NK, apenas para a intensidade de expressão de IL-10 ( $p < 0,0001$ , teste de *Kruskal-Wallis*). Na comparação entre duas subpopulações celulares (pós teste de *Dunn*), observamos:

- MFI de IL10:**
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > NK$  totais ( $p < 0,01$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,01$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,001$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{bright}CD16^{+}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > NK$  totais ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,05$ )
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,01$ )

A maior parte das diferenças estiveram associadas à maior intensidade de expressão para células  $CD56^{bright}$ .

► **Grupo EDT:**

- **CD107a**: observamos diferenças significantes, tanto na % como na intensidade de expressão (MFI), de CD107a, entre várias subpopulações de células NK ( $p < 0,0001$ , teste de *Kruskal-Wallis*). Na comparação entre duas subpopulações celulares (pós teste de *Dunn*), observamos:

- % de CD107a:**
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{bright}$  ( $p < 0,01$ )

- $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $p < 0,05$ )
- MFI para CD107a:**
- $CD56^{bright} > NK$  totais ( $p < 0,001$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}$  ( $p < 0,001$ )
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p < 0,001$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD16^{-}$  ( $p < 0,0001$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > NK$  totais ( $p < 0,01$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{dim} > CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $p < 0,001$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{dim}CD16^{+} > CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $p < 0,001$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $p < 0,0001$ ) (*não encontrada no CTR*)

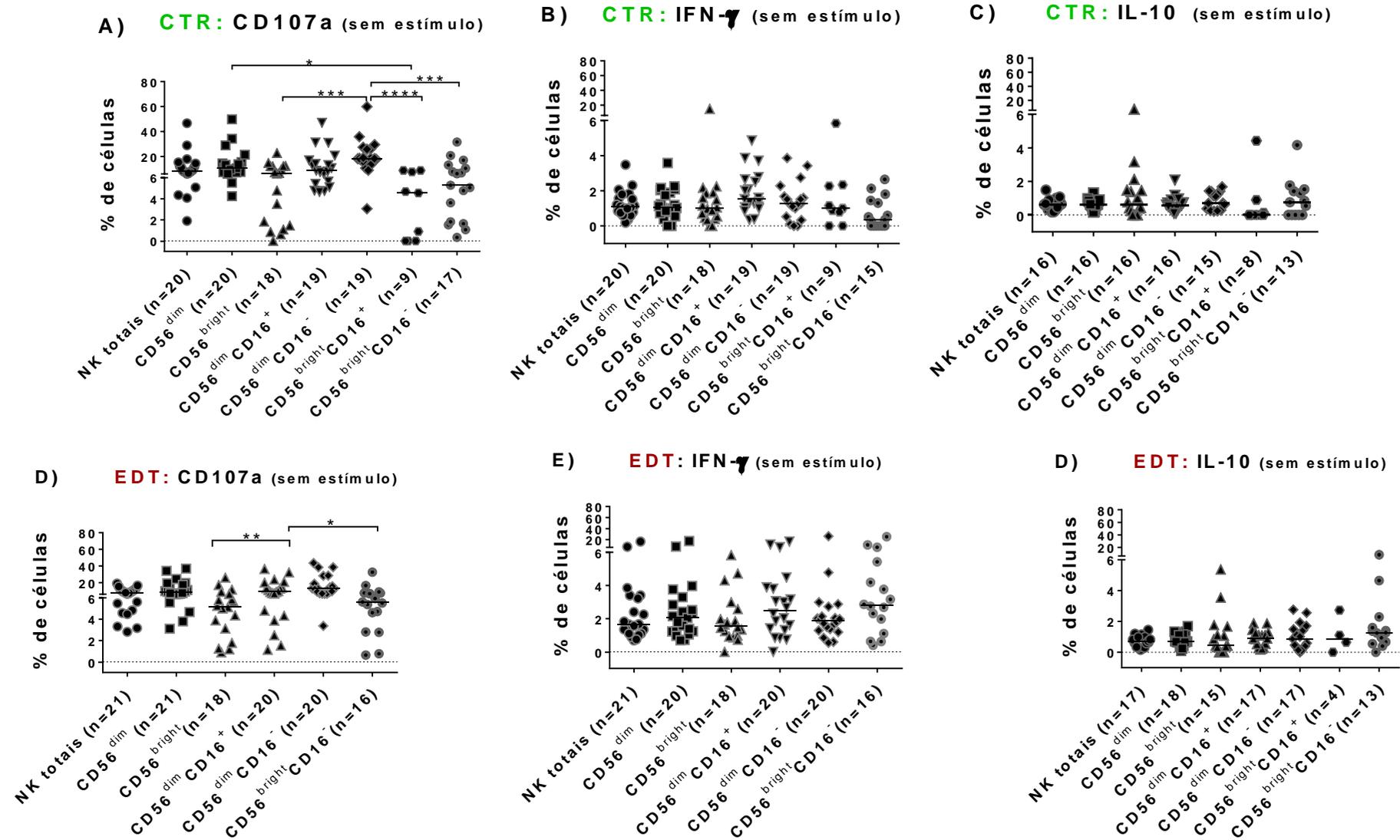
A maior frequência de expressão de CD107a esteve associada à presença de células CD56dim+. No entanto, para intensidade de expressão, tanto CD56bright+ como CD56dim+, tiveram associação.

- **IFN- $\gamma$ :** não observamos diferenças tanto para a % ( $p = 0,4093$ ) de IFN- $\gamma$  como para a intensidade de expressão ( $p = 0,8755$ ), entre as subpopulações de NK (teste de *Kruskal-Wallis*).

- **IL-10:** não observamos diferença da % de expressão de IL-10 entre as subpopulações de NK, mas tivemos diferenças para intensidade de expressão de IL-10 ( $p = 0,0164$ , teste de *Kruskal-Wallis*). Na comparação entre duas subpopulações celulares, observamos:

- MFI para IL-10:**
- $CD56^{bright} > NK$  totais ( $p = 0,0358$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{bright} > CD56^{dim}$  ( $p = 0,0293$ ) (*não encontrada no CTR*)
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p = 0,0329$ )
  - $CD56^{bright}CD16^{-} > CD56^{dim}$  ( $p = 0,0104$ )
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{dim}$  ( $p = 0,0199$ )
  - $CD56^{dim}CD16^{-} > CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $p = 0,0477$ )

De forma geral, a maior parte das diferenças para intensidade de fluorescência de IL-10, no grupo EDT, estiveram associadas à maior intensidade de expressão da subpopulação CD56bright. A subpopulação CD56brightCD16+ não foi analisada para o grupo EDT devido ao baixo número de amostras que atingiram o valor de corte válido na aquisição no citômetro de fluxo ( $\geq 100$ ).



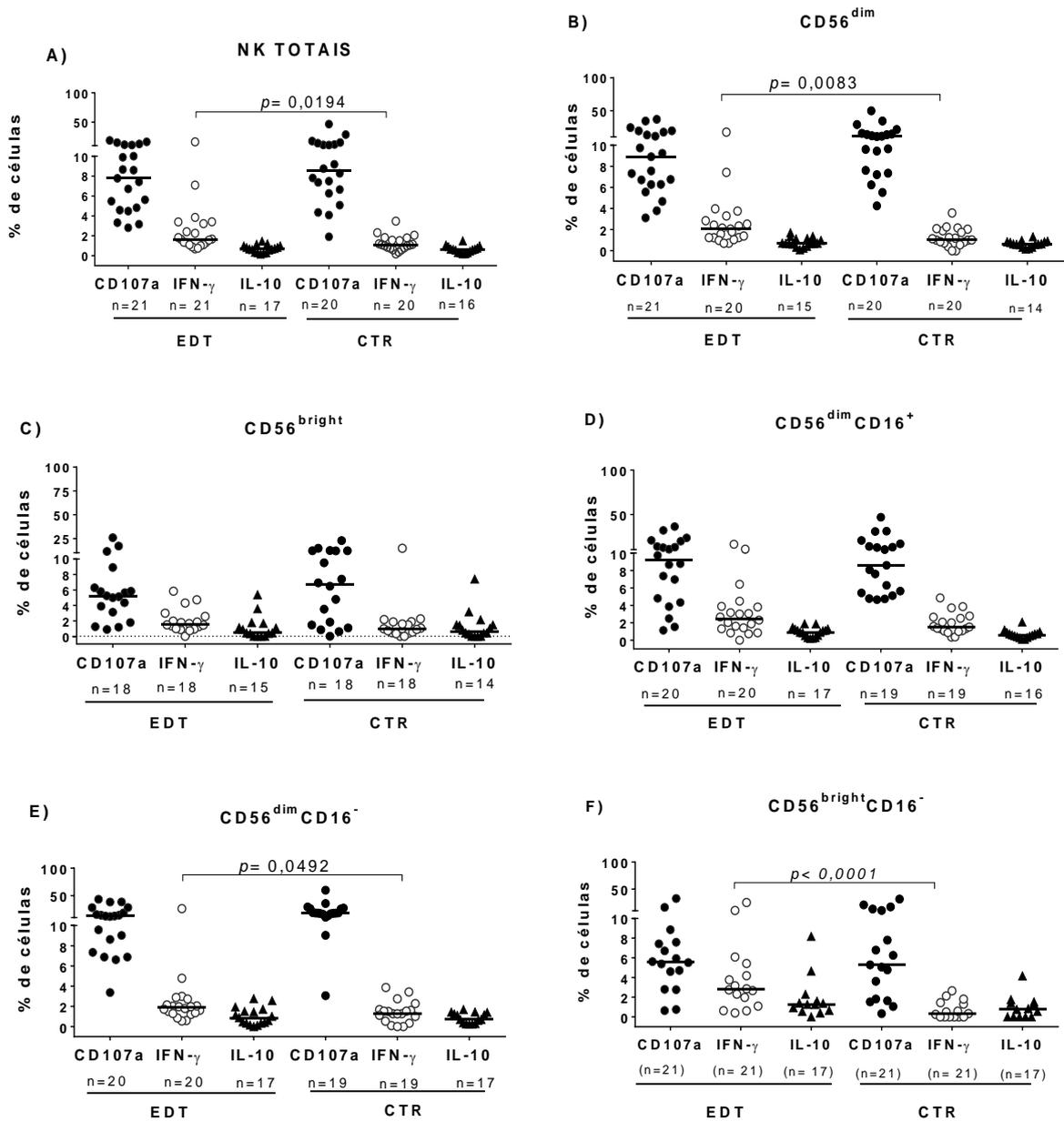
**Figura 35. Análise da frequência de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, entre as subpopulações de células NK, nos grupos EDT e CTRs, no estado basal de cultura (sem estímulo).** EDT: grupo endometriose; CTR grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; as barras horizontais representam as medianas das frequências de expressão de cada grupo; linha pontilhada: indica o valor de zero para porcentagem (%) de células com expressão; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A % e a intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações NK foram também comparadas entre os grupos, EDT e CTRs. Para todas as análises, utilizamos o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (análises de %, Figura 36; análises MFI, Tabela 9). A subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> não foi analisada no grupo CTR devido ao baixo número de amostras que atingiram o valor de corte válido para aquisição no citômetro de fluxo ( $\geq 100$  eventos).

**Tabela 9.** Análise da intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas subpopulações de células NK, entre grupos EDT e CTRs, **na condição basal de cultura, sem estímulo.**

Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN $\gamma$					IL-10				
	EDT		CTR		<i>p</i>	EDT		CTR		<i>p</i>	EDT		CTR		<i>p</i>
(n)	med	(n)	med	(n)		med	(n)	med	(n)		med	(n)	med		
<b>NK totais</b>	21	358,0	20	336,0	ns	21	83,9	20	97,2	ns	17	<b>127,0</b>	16	49,1	<b>0,0281</b>
<b>CD56<sup>dim</sup></b>	21	350,0	20	327,5	ns	21	83,6	20	99,4	ns	18	<b>119,0</b>	16	37,0	<b>0,0428</b>
<b>CD56<sup>bright</sup></b>	18	469,0	18	452,0	ns	18	80,8	18	92,6	ns	15	90,1	14	3,0	ns
<b>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup></b>	20	9,3	19	8,6	ns	20	2,5	19	1,5	ns	17	0,9	16	0,6	ns
<b>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup></b>	20	303,0	19	340,0	ns	20	80,1	19	122,1	ns	17	144,0	15	139,0	ns
<b>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup></b>	4	498,0	9	489,0	NA	4	70,2	9	114,0	NA	4	72,7	8	82,8	NA
<b>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup></b>	16	462,0	17	438,0	ns	16	69,0	15	104,0	ns	13	158,0	13	143,0	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação, na análise entre os grupos EDT e CTR; em negrito: valores de *p* significantes na análise entre os grupos (<0,05); em vermelho: maior valor de mediana entre os grupos analisados; valores de *p* determinados pelo teste de Mann-Whitney.



**Figura 36.** Comparação da frequência de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição basal, sem estímulo. EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*; n: número de mulheres analisadas para cada molécula, em cada grupo; as barras horizontais representam as medianas de porcentagem de expressão de cada molécula.

❖ **Análise de correlação entre as moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK, na condição basal, sem estímulo:**

Avaliamos se há correlação entre as frequências e/ou intensidades de expressão das moléculas CD107a e IFN- $\gamma$  e IL-10, na condição basal de cultura. As análises, com a determinação dos valores de  $p$  e  $r$ , foram realizadas pelo teste de correlação de *Spearman*.

► **Grupo CTR**: observamos **correlações positivas** entre:

• **CD107a e IL-10** (para a MFI) nas populações celulares abaixo (correlações observadas apenas no grupo CTR):

- NK totais ( $r= 0,6$ ,  $p=0,0171$ )
- CD56<sup>dim</sup> ( $r= 0,6$ ,  $p=0,0244$ )
- CD56<sup>bright</sup> ( $r= 0,7$ ,  $p=0,0016$ )
- CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r= 0,5$ ,  $p=0,0395$ )
- CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r= 0,8$ ,  $p=0,0014$ )

► **Grupo EDT**: foram observadas **correlações positivas** entre:

• **CD107a e IL-10** (para %), em células com fenótipo descrito com maior citotoxicidade, CD56<sup>dim</sup> ( $r= 0,5$ ,  $p= 0,0479$ ) (correlação observada apenas no grupo EDT; no grupo CTR a correlação foi com MFI).

• **IFN- $\gamma$  e IL-10** (para %), em células com fenótipo descrito com maior citotoxicidade: CD56<sup>dim</sup> ( $r= 0,7$ ,  $p=0,0036$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,5$ ,  $p=0,0465$ ) (correlação observada apenas no grupo EDT).

• **IFN- $\gamma$  e CD107a** (para MFI), em células CD56<sup>bright</sup> ( $r= 0,5$ ,  $p= 0,0326$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r= 0,5$ ,  $p= 0,0452$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r= 0,6$ ,  $p= 0,0257$ ). Destacamos que as subpopulações CD56<sup>bright</sup> + são descritas com propriedade imunorreguladora (correlações observadas apenas no grupo EDT).

Na Tabela 10 estão apresentados os dados significantes de correlação, nos grupos EDT e CTRs saudáveis, tanto para a frequência de células produtoras como para a intensidade de produção (MFI), em cada subpopulação de células NK. Na Figura 37 estão apresentados exemplos de correlações entre as expressões de moléculas de ativação NK, para a subpopulação CD56<sup>dim</sup>.

A subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> não foi analisada no grupo EDT, uma vez que não atingiu o número mínimo de eventos adquiridos no citômetro de fluxo ( $\geq 100$ ).

**Tabela 10.** Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose e controles, **na condição basal de cultura, sem estímulo.**

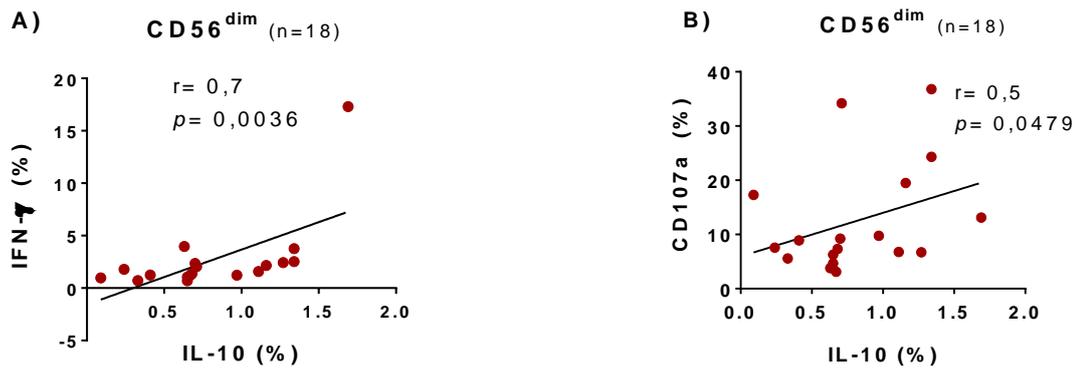
A) Grupo endometriose

Subpopulações	Sem estímulo (frequência de células com expressão, %)								
	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	$p$	$r$	EDT (n)	$p$	$r$	EDT (n)	$p$	$r$
NK totais	17	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	<b>0.0036</b>	<b>0.7</b>	21	ns	ns	18	<b>0,0479</b>	<b>0,5</b>
CD56 <sup>brigh</sup>	15	ns	ns	18	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	<b>0.0465</b>	<b>0.5</b>	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)								
	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	$p$	$r$	EDT (n)	$p$	$r$	EDT (n)	$p$	$r$
NK totais	17	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	15	ns	ns	18	<b>0.0326</b>	<b>0.5</b>	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	20	<b>0.0452</b>	<b>0.5</b>	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	<b>0.0257</b>	<b>0.6</b>	13	ns	ns

B) Grupo controle

Subpopulações	Sem estímulo (frequência de células com expressão, %)								
	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	$p$	$r$	CTR (n)	$p$	$r$	CTR (n)	$p$	$r$
NK totais	16	ns	ns	20	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	20	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	16	ns	ns	18	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	19	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	19	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	9	ns	ns	8	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns
Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)								
	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	$p$	$r$	CTR (n)	$p$	$r$	CTR (n)	$p$	$r$
NK totais	16	ns	ns	20	ns	ns	16	<b>0.0171</b>	<b>0.6</b>
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	20	ns	ns	16	<b>0.0244</b>	<b>0,6</b>
CD56 <sup>brigh</sup>	16	ns	ns	18	ns	ns	16	<b>0.0016</b>	<b>0,7</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	19	ns	ns	16	<b>0.0395</b>	<b>0,5</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	19	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	9	ns	ns	8	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	15	ns	ns	13	<b>0.0014</b>	<b>0,8</b>

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; n: número de pares de dados analisados em cada subpopulação celular; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); em negrito: valores de  $p$  considerados significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de  $r$ ; em negrito e sublinhado: correspondem a correlações diferenciais entre os grupos EDT e CTR; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ), valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de Spearman.



**Figura 37. Análise de correlação entre a porcentagem de células com expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, na subpopulação CD56<sup>dim</sup> circulante, de mulheres com endometriose, na condição basal de cultura, sem estímulo. A) correlação entre as porcentagens (%) de expressão das moléculas IFN- $\gamma$  e IL-10; B) correlação entre as % de expressão das moléculas CD107a e IL-10; n= números de pares de dados analisados; valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de Spearman.**

**Balanco das principais diferenças entre os grupos EDT e CTR, na condição basal, sem estímulo:**

- ✓ **IFN- $\gamma$  (%):** EDT > CTR (em NK totais, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>)
- ✓ **IL-10 (MFI):** EDT > CTR (em NK totais e CD56<sup>dim</sup>)
- ✓ **Correlações positivas entre CD107a e IL-10 (MFI):** apenas no grupo CTR (em NK totais, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>)
- ✓ **Correlação positiva entre CD107a e IL-10 (%):** apenas no grupo EDT (em CD56<sup>dim</sup>)
- ✓ **Correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e IL-10 (%):** apenas no grupo EDT (em CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>)
- ✓ **Correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e CD107a (MFI):** apenas no grupo EDT (em CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>)

#### 4.4.2.2....Moléculas de atividade NK: na condição com estímulo com células K562

Inicialmente, realizamos uma análise pareada para a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, para as condições sem estímulo e após o estímulo com K562, com o objetivo de avaliar a presença de alteração significativa de expressão, com o estímulo. Foram realizadas análises pareadas das amostras, separadamente, dentro dos grupos EDT e CTR, em células NK totais e em suas subpopulações, utilizando-se o teste de *Wilcoxon*.

► **Grupo CTR:** o estímulo com células K562 induziu um aumento significativo de CD107a e IFN- $\gamma$ , tanto na % de células positivas como na intensidade de expressão, em quase todas as subpopulações de NK, exceto para IFN- $\gamma$  em células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \geq 0,05$ ). Para IL-10, houve um aumento de MFI na presença do estímulo K562 na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, mas sem modificação na % de células (Tabela 11).

► **Grupo EDT:** o estímulo com células K562 também induziu um aumento da % de células com expressão de CD107a e de IFN- $\gamma$ , em todas as subpopulações de NK, exceto para as células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, da mesma forma como observado no grupo CTR. Também houve aumento da intensidade de expressão para CD107a, mas, diferentemente do grupo CTR, não para IFN- $\gamma$ , nas mesmas subpopulações, exceto na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>. Houve diminuição de MFI para IL-10 nas subpopulações CD56<sup>bright</sup> ( $p = 0,0173$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p = 0,0359$ ) (no grupo CTR, houve aumento de IL-10 na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>). Para % de células, assim como no grupo CTR, não houve modificação na % de células produtoras de IL-10 ( $p > 0,05$ , teste de *Wilcoxon*) (Tabela 11).

As modificações ocorridas após o estímulo com células K562, em relação à condição sem estímulo, nos grupos EDT e CTR estão descritas na Tabela 11. Na Figura 38 apresentamos algumas modificações significativas ocorridas após o estímulo com K562

**Tabela 11.** Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose (A) e controles (B), **entre as condições sem estímulo e após estímulo com células K562.**

A) Grupo endometriose

SE x K562 (frequência de células com expressão, %)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	EDT (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>	EDT (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>	EDT (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>
NK totais	21	7,8	23,2	<0,0001	21	1,7	5,0	0,0009	17	0,7	0,9	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	8,9	27,5	<0,0001	21	2,1	5,2	0,0009	18	0,7	0,7	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	17	5,1	23,0	<0,0001	17	1,7	5,2	0,0005	15	0,4	0,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	9,3	29,1	<0,0001	20	2,5	5,7	0,0020	17	0,9	0,8	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	25,7	39,2	<0,0001	20	1,9	8,3	0,0013	17	0,9	0,7	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	5,0	14,6	NA	4	0,6	2,1	NA	4	0,9	1,4	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	5,6	31,0	<0,0001	16	2,8	8,2	0,0182	13	1,3	1,4	ns

SE x K562 (intensidade de expressão, MFI)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	EDT (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>	EDT (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>	EDT (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>
NK totais	21	358,0	422,0	<0,0001	21	84	80,7	ns	17	127,0	115,0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	350,0	411,0	<0,0001	21	84	83,2	ns	18	119,0	113,5	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	17	463,0	529,0	0,0003	17	71	69,0	ns	15	143,0	138,0	<u>0,0173</u>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	347,0	412,5	<0,0001	20	76	78,9	ns	17	90,1	94,2	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	303,0	378,0	<0,0001	20	80	91,0	ns	17	144,0	139,0	<u>0,0359</u>
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	498,0	557,0	NA	4	70	66,9	NA	4	72,7	44,5	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	462,0	543,5	0,0010	16	69	72,0	ns	13	158,0	142,0	ns

EDT: grupo endometriose; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); SE: condição basal, sem estímulo; K562: estímulo com células K562; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup>; CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>med: mediana; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; em negrito: valores de *p* considerados significantes (<0,05, na análise entre SE e K562); em negrito e sublinhado: diferença ausente no grupo CTR; em vermelho: valores de medianas significantes aumentadas em relação à condição SE; em azul: valores de medianas significantes e diminuídos em relação à condição SE; ns: não significantes ( $p \geq 0,05$ ); NA: não analisado; valores de *p* determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.

**Continuação da Tabela 11.** Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose e controles, **entre as condições sem estímulo e após estímulo com células K562**

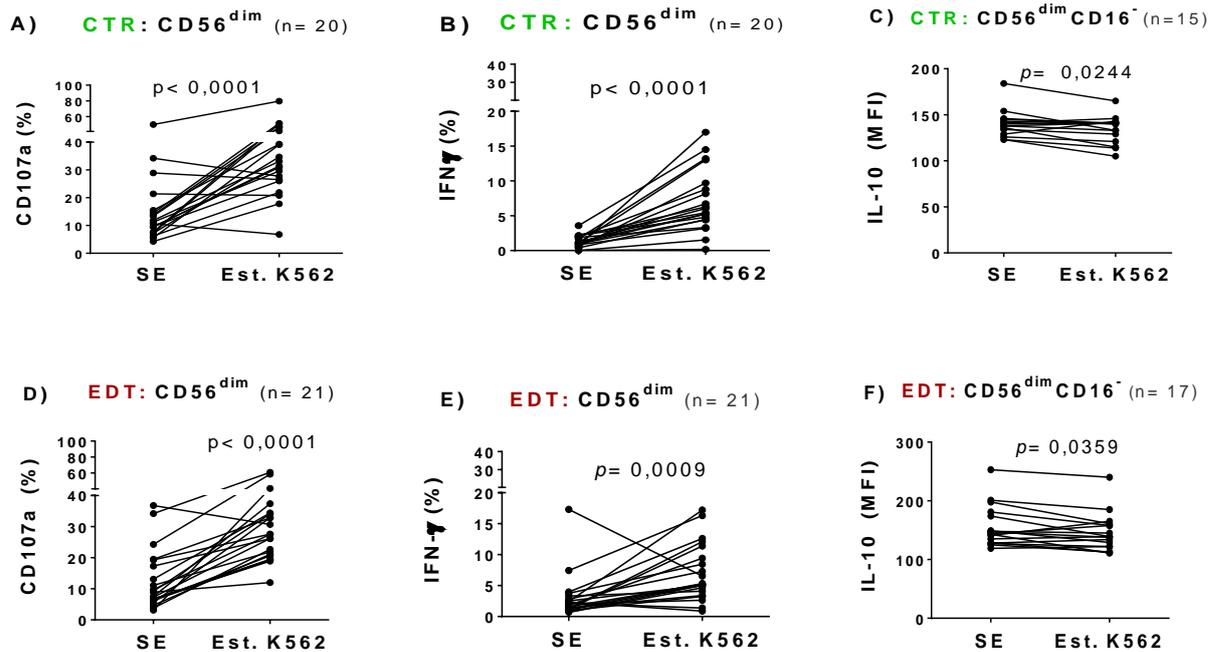
B) Grupo controle

Subpopulações	SE x K562 (frequência de células com expressão, %)											
	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	CTR (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>	CTR (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>	CTR (n)	SE med (%)	K562 med (%)	<i>p</i>
NK totais	20	8,5	30,6	<0,0001	20	1,1	5,7	<0,0001	16	0,6	0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup>	20	10,9	32,3	<0,0001	20	1,1	5,7	<0,0001	16	0,6	0,6	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	6,9	29,9	<0,0001	17	1,1	6,2	0,0001	14	0,9	0,9	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	18	8,3	38,3	<0,0001	18	1,4	5,1	0,0003	16	0,6	0,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	19	18,3	34,7	0,0005	19	1,3	9,2	<0,0001	15	0,7	0,8	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	2,7	19,5	0,0078	8	1,1	2,3	ns	7	0,0	1,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	5,3	38,1	<0,0001	15	0,3	8,2	0,0002	13	0,8	0,6	ns

Subpopulações	SE x K562 (intensidade de expressão, MFI)											
	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	CTR (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>	CTR (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>	CTR (n)	SE med (MFI)	K562 med (MFI)	<i>p</i>
NK totais	20	336,0	441,5	0,0001	20	97,2	112,5	0,0153	16	49,1	81,8	ns
CD56 <sup>dim</sup>	20	327,5	433,5	<0,0001	20	99,4	113,5	0,0140	16	37,0	77,6	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	444,0	539,0	<0,0001	17	92,7	126,0	0,0079	14	131,5	133,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	18	322,0	391,5	0,0016	18	86,9	94,5	0,0159	16	3,0	13,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	19	340,0	455,0	0,0005	19	122,0	143,0	0,0237	15	138,0	140,0	0,0244
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	466,0	533,0	0,0078	8	111,5	123,5	ns	7	84,8	108,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	438,0	522,0	<0,0001	15	104,0	127,0	0,0151	13	143,0	154,0	ns

CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); SE: condição basal, sem estímulo; K562: estímulo com células K562 NK totais; incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; med: mediana; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; em negrito: valores de *p* considerados significantes (<0,05, na análise entre SE e K562); em negrito e sublinhado: diferença ausente no grupo EDT; em vermelho: valores de mediana aumentados em relação à condição SE; ns: não significantes ( $p \geq 0,05$ ); valores de *p* determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.



**Figura 38. Alterações significativas ocorridas após o estímulo com K562 (Est. K562), em relação à condição sem estímulo, em mulheres com endometriose e controles. A)** frequência de expressão de CD107a na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, em CTR; **B)** frequência de expressão de IFN- $\gamma$  na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, em CTR; **C)** intensidade de expressão (MFI) de IL-10 na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, em CTR; **D)** frequência de expressão de CD107a na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, na EDT; **E)** frequência de expressão de IFN- $\gamma$  na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, na EDT; **F)** intensidade de expressão (MFI) de IL-10 na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, na EDT; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; SE: condição basal, sem estímulo; valores de  $p$  determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.

► **Grupo EDT vs grupo CTR:** na comparação da expressão (% e MFI) das moléculas de atividade NK entre os grupos EDT e CTR, frente ao estímulo com células K562, observamos algumas diferenças (Figura 39 e Tabela 12) (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*):

- **CD107a:** apesar de não ter havido diferenças entre os grupos na condição sem estímulo, na presença de estímulo, observamos:

- % de CD107a: EDT < CTR, em células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p = 0,0455$

- MFI para CD107a: EDT < CTR, em células:

- NK totais  $p = 0,0233$
- CD56<sup>dim</sup>  $p = 0,0308$
- CD56<sup>bright</sup>  $p = 0,0097$

- **IFN- $\gamma$ :** a diferença observada para a maior % de células com expressão de IFN- $\gamma$  na EDT, na condição sem estímulo (Figura 36), foi perdida na condição de estímulo com células K562. No entanto, com estímulo, observamos menor MFI na EDT, em

relação ao grupo CTR, em quase todas as subpopulações celulares de NK (Figura 37 e Tabela 12):

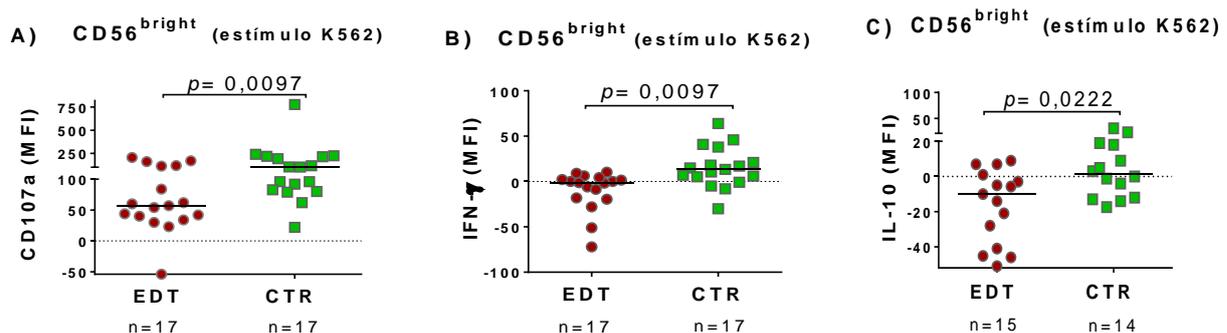
- MFI para IFN- $\gamma$ : EDT < CTR, em células:

- NK totais  $p= 0,0233$
- CD56<sup>dim</sup>  $p= 0,0308$
- CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>  $p= 0,0143$
- CD56<sup>bright</sup>  $p= 0,0097$
- CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>  $p= 0,0135$

• **IL-10:** não foi observada diferença para a % de células entre os grupos. Porém, observamos menor intensidade de expressão de IL-10 no grupo EDT em relação ao grupo CTR:

- MFI para IL-10: EDT < CTR, na subpopulação: **CD56<sup>bright</sup>** ( $p= 0,0222$ )

Na Figura 39 apresentamos alguns exemplos de diferenças significantes na intensidade de expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, entre os grupos EDT e CTR, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>. Na Tabela 12 estão os dados de diferenças significantes para as moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK, CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, entre os grupos EDT e CTR, tanto para a frequência de células com produção, como para a intensidade de produção (MFI), nas diferentes subpopulações de células NK.



**Figura 39. Comparação da intensidade de expressão de moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK na subpopulação CD56<sup>bright</sup> circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição após estímulo com células K562. A) MFI de CD107a; B) MFI de IFN- $\gamma$ ; C) MFI de IL-10; linha pontilhada: indica o valor de zero para MFI; as barras horizontais representam as medianas de MFI de cada grupo; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; MFI: mediana e intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

**Tabela 12.** Comparação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição após **estímulo com células K562**.

Subpopulações	Estímulo com K562 (frequência de células com expressão, %)														
	CD107a					IFN $\gamma$					IL-10				
	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>
NK totais	21	14,5	20	20,7	ns	21	3,6	20	4,2	ns	17	-0,1	16	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	16,4	20	21,6	ns	21	4,1	20	4,2	ns	18	-0,1	16	0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	18,2	17	23,0	ns	17	4,1	17	4,7	ns	15	0,1	14	-0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	20,4	18	28,6	ns	20	3,0	18	3,6	ns	17	-0,1	16	0,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	17,1	19	16,2	ns	20	5,7	19	8,2	ns	17	-0,1	15	0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	11,1	8	19,1	NA	4	3,2	8	1,2	NA	4	1,1	7	0,8	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	20,3	17	<b>31,3</b>	<b>0,0445</b>	16	6,1	15	8,2	ns	13	-0,1	13	0,0	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN $\gamma$					IL-10				
	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	CTR med	(n)	med	<i>p</i>
NK totais	21	54,0	20	<b>98,5</b>	<b>0,0233</b>	21	-0,3	20	<b>14,8</b>	<b>0,0278</b>	17	0,0	16	4,7	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	51,0	20	<b>97,0</b>	<b>0,0308</b>	21	-0,4	20	<b>15,6</b>	<b>0,0474</b>	18	0,0	16	1,5	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	57,0	17	<b>102,0</b>	<b>0,0097</b>	17	-1,3	17	<b>13,3</b>	<b>0,0010</b>	15	-10,0	14	<b>1,5</b>	<b>0,0222</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	59,0	18	75,5	ns	20	-3,3	18	<b>17,0</b>	<b>0,0143</b>	17	0,0	16	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	103,0	19	106,0	ns	20	7,0	19	14,0	ns	17	-12,0	15	-5,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	59,0	8	109,0	NA	4	-3,4	8	2,5	NA	4	-8,0	7	11,0	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	60,5	17	115,0	ns	16	1,4	15	<b>10,1</b>	<b>0,0135</b>	13	-14,0	13	-4,0	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; med: mediana; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; estímulo com K562: descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; NA: não analisado; em negrito: valores de *p* considerados significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor da maior mediana significativa entre os grupos EDT e CTR; ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

### **Análises de correlação entre as moléculas envolvidas na atividade de células NK, após o estímulo com células K562:**

As análises para avaliar se há presença de correlação entre a expressão das moléculas CD107a e IFN- $\gamma$  e IL-10 foram realizadas, tanto para a % como para a intensidade de expressão (MFI). Os valores de *p* e *r* foram determinados pelo teste de correlação de *Spearman* (Tabela 13):

#### **► Grupo CTR: correlações positivas entre:**

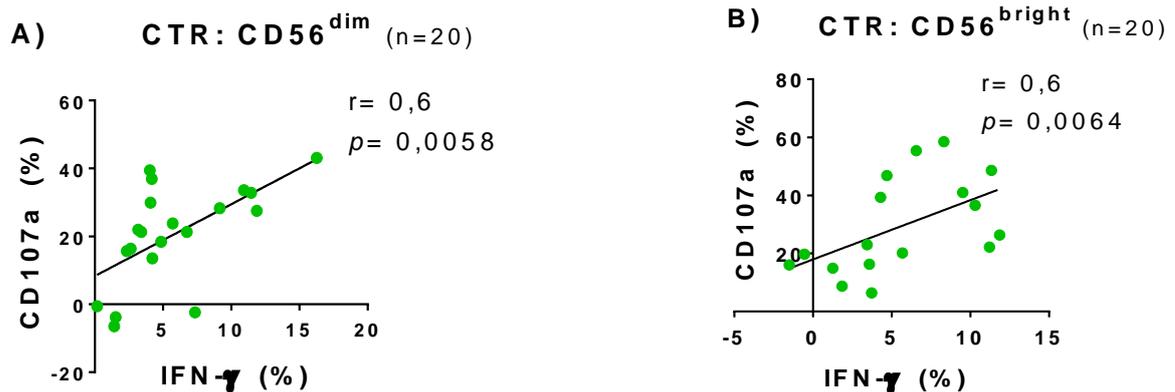
- **IFN- $\gamma$  e CD107a** (para % de expressão), em quase todas as subpopulações celulares: NK totais ( $r=0,7$ ,  $p=0,0007$ ), CD56<sup>dim</sup> ( $r=0,6$ ,  $p=0,0058$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $r=0,6$ ,  $p=0,0064$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,7$ ,  $p=0,0011$ ) (todas as correlações presentes apenas no grupo CTR).

► **Grupo EDT: correlações positivas** entre:

- **IFN- $\gamma$  e IL-10** (para intensidade de expressão) nas subpopulações: CD56<sup>dim</sup> ( $r=0,6$ ,  $p=0,0048$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $r=0,7$ ,  $p= 0,0024$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r=0,5$ ,  $p= 0,0302$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,6$ ,  $p= 0,015$ )

(Correlações previamente observadas na condição basal, sem estímulo - para a frequência de expressão; todas essas correlações não foram observadas no grupo CTR).

Na Figura 40 estão apresentados alguns exemplos de correlações positivas observadas em ambos os grupos de estudo. Na Tabela 13 estão apresentados os dados significantes de correlações observadas nos grupos EDT e CTR, tanto para a frequência como para a intensidade de produção, em cada subpopulação de células NK.



**Figura 40.** Análise de correlação entre as frequências de células positivas, e entre as intensidades de expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, em subpopulações de células NK circulantes, de mulheres do grupo controle, na condição após estímulo com K562. **A)** correlação entre as frequências de expressão de IFN- $\gamma$  e CD0107, em células CD56<sup>dim</sup>; **B)** correlação entre as frequências de expressão de IFN- $\gamma$  e CD107a, em CD56<sup>bright</sup>; CTR: grupo controle; n: número de pares de dados analisados; valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

**Tabela 13.** Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e entre as intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose (A) e controles (B), na condição após **estímulo com células K562**.

A) Grupo endometriose

Estímulo com K562 (frequência de células com expressão, %)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>
NK totais	17	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	15	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	EDT (n)	<i>p</i>	<i>r</i>
NK totais	17	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	<b><u>0,0048</u></b>	<b>0,6</b>	21	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	17	<b><u>0,0024</u></b>	<b>0,7</b>	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	<b><u>0,0302</u></b>	<b>0,5</b>	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	<b><u>0,0150</u></b>	<b>0,6</b>	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns

B) Grupo controle

Estímulo com K562 (frequência de células com expressão, %)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>
NK totais	16	ns	ns	20	<b><u>0,0007</u></b>	<b>0,7</b>	16	<b><u>0,0436</u></b>	<b>-0,5</b>
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	20	<b><u>0,0058</u></b>	<b>0,6</b>	16	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	15	ns	ns	17	<b><u>0,0064</u></b>	<b>0,6</b>	14	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	18	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	19	<b><u>0,0011</u></b>	<b>0,7</b>	15	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns
Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>	CTR (n)	<i>p</i>	<i>r</i>
NK totais	16	ns	ns	20	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	20	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	15	ns	ns	17	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	18	ns	ns	16	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	19	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); estímulo com K562: descontando-se o valor basal (sem estímulo), NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de *r*; em negrito e sublinhado: correspondem a correlações diferenciais entre os grupos EDT e CTR; ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ), NA: não analisado; valores de *p* e *r* determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

**Balanco das principais diferenças entre os grupos EDT e CTR, após o estímulo com células K562:**

- ✓ **CD107a (%)**: EDT < CTR (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>)
- ✓ **CD107a (MFI)**: EDT < CTR (NK totais, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>)
- ✓ **IFN- $\gamma$  (MFI)**: EDT < CTR (NK totais, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>)

*Ou seja, a expressão de CD107a (% e intensidade de expressão), assim como a intensidade de expressão de IFN- $\gamma$ , foram menores nas mulheres com EDT.*

- ✓ **Correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e CD107a (MFI)**: apenas no grupo CTR (NK totais, CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>)
- ✓ **Correlações positivas entre IFN- $\gamma$  e IL-10 (MFI)**: apenas no grupo EDT (CD56<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>)

#### 4.4.2.3 Na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA

O bloqueio de MICA nas células K562 (K562BLOQ), representando o potencial efeito da presença de sMICA, praticamente não induziu modificações (Tabela 14), em relação aos eventos que ocorreram na condição com o estímulo com K562, sem bloqueio (Tabela 13). Houve apenas duas mudanças, estatisticamente significantes, e apenas no grupo EDT: diminuição da porcentagem de células produtoras de IL-10 nas subpopulações CD56<sup>bright</sup> ( $p=0,0479$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p=0,0105$ ) (Tabela 14A). Ou seja, com o bloqueio de MICA, permaneceram as mesmas modificações induzidas pelo estímulo com K562, na ausência de bloqueio (valores de  $p$  determinados pelo teste pareado de *Wilcoxon*).

**Tabela 14.** Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose (A) e controles (B), entre as condições após estímulo K562, e após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.

A) Grupo endometriose

K562 x K562BLOQ (frequência de células com expressão, %)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	EDT (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>	EDT (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>	EDT (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>
NK totais	21	14,5	16,8	ns	21	3,6	3,0	ns	17	-0,1	-0,2	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	16,4	18,5	ns	21	4,1	3,1	ns	18	-0,1	-0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	17,7	18,4	ns	15	4,3	4,3	ns	13	0,1	<b>-0,1</b>	<b>0,0479</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	20,3	29,0	ns	20	5,9	6,4	ns	17	0,8	0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	17,1	20,5	ns	20	5,7	6,0	ns	17	-0,1	-0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	11,1	6,4	NA	4	2,1	6,4	NA	4	5,1	2,3	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	20,3	25,0	ns	16	6,1	3,3	ns	13	-0,1	<b>-0,6</b>	<b>0,0105</b>
K562 x K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	EDT (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>	EDT (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>	EDT (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>
NK totais	21	54,0	57,0	ns	21	-0,3	0,5	ns	17	-12,0	-15,0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	51,0	69,0	ns	21	-0,4	2,1	ns	18	0,0	0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	60,0	65,0	ns	15	0,0	-0,3	ns	13	-5,7	-15,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	59,0	55,5	ns	20	-3,3	-0,1	ns	17	0,0	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	103,0	121,5	ns	20	7,0	9,9	ns	17	-12,0	-6,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	59,0	54,5	NA	4	-3,4	-5,4	NA	4	-8,0	-6,0	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	60,5	70,5	ns	16	1,4	2,0	ns	13	-14,0	-14,0	ns

EDT: grupo endometriose; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562: estímulo com células K562 descontando-se o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontado do valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; med: mediana; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ); em negrito e sublinhado: diferença ausente no grupo CTR; em azul: valor da mediana diminuída em relação ao estímulo com K562 sem bloqueio; ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ); NA: não analisado; valores de *p* determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.

**Continuação Tabela 14.** Comparação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e das intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose (A) e controles (B), entre as condições após estímulo K562, e após **estímulo com células K562 bloqueadas para MICA**.

B) Grupo controle

K562 x K562BLOQ (frequência de células com expressão, %)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	CTR (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>	CTR (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>	CTR (n)	K562 med (%)	K562BLOQ med (%)	<i>p</i>
NK totais	19	21,2	17,3	ns	19	4,2	4,5	ns	14	0,0	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup>	19	22,0	22,0	ns	19	4,2	4,4	ns	14	0,1	0,3	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	16	24,7	22,6	ns	16	5,2	5,6	ns	12	-1,8	-1,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	29,1	25,8	ns	17	3,3	3,1	ns	13	0,4	0,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	16,0	13,9	ns	18	12,7	11,3	ns	14	-0,2	0,2	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	21,2	30,3	ns	7	0,3	0,9	ns	5	0,0	0,3	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	38,0	22,0	ns	14	8,3	6,2	ns	11	0,0	0,0	ns
K562 x K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)												
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
	CTR (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>	CTR (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>	CTR (n)	K562 med (MFI)	K562BLOQ med (MFI)	<i>p</i>
NK totais	19	108,0	87,0	ns	19	17,0	18,0	ns	14	4,7	19,8	ns
CD56 <sup>dim</sup>	19	107,0	87,0	ns	19	17,0	20,1	ns	14	1,5	21,2	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	16	102,5	112,0	ns	16	14,1	15,8	ns	12	1,5	3,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	76,0	94,0	ns	17	18,0	20,0	ns	13	0,0	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	102,0	83,0	ns	18	11,5	11,0	ns	14	-5,5	-2,5	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	126,0	99,0	ns	7	2,0	6,4	ns	5	1,7	4,0	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	121,0	157,0	ns	14	10,3	9,8	ns	11	-2,0	-12,0	ns

CTR: grupo controle; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562: estímulo com células K562 descontando-se o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; med: mediana; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; ns: não significativa ( $p \geq 0,05$ ); valores de *p* determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.

Apesar de o bloqueio de MICA, praticamente, não ter modificado o que ocorreu com o estímulo com K562, na análise do balanço final entre os grupos EDT e CTRs (teste de *Mann-Whitney*), na condição de bloqueio, observamos algumas diferenças significativas:

- (i) Menor intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  no grupo EDT em 5 populações celulares, NK totais ( $p= 0,0084$ ), CD56<sup>dim</sup> ( $p= 0,0128$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $p= 0,0308$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p= 0,0126$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0308$ ), em comparação com o grupo CTR (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*) (Tabela 15). Destacamos que essas diferenças já eram estatisticamente significantes na condição sem bloqueio, para as mesmas populações (Tabela 12);
- (ii) Ainda em relação a IFN- $\gamma$ , o bloqueio induziu uma diferença significativa que não havia na condição apenas com estímulo K562: menor frequência de células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no grupo EDT ( $p= 0,0275$ , teste de *Mann-Whitney*) (Tabela 15);
- (iii) As outras diferenças encontradas entre os grupos EDT e CTR, após o bloqueio de MICA, foram em relação à IL-10: menor porcentagem de células CD56<sup>dim</sup> produtoras de IL-10, no grupo EDT ( $p= 0,0067$ ); e menor intensidade de expressão de IL-10 no grupo EDT, para células NK totais ( $p= 0,0308$ ), em relação ao grupo CTR. Essas diferenças não foram significativas na condição após estímulo com K562 sem bloqueio (Tabela 12). Encontramos também menor intensidade de expressão de IL-10 na população de células CD56<sup>bright</sup> ( $p= 0,0329$ ) do grupo EDT, mas essa diferença já era significativa na condição após estímulo K562 sem bloqueio (Tabela 12); (valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*). Esses dados comparativos, entre os grupos EDT e CTR, estão apresentados na Tabela 15.

Em relação à expressão de CD107a, é interessante destacar que a diferença de menor % de células produtoras para CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> no grupo EDT, em relação ao grupo CTR, observada na condição após estímulo com células K562 ( $p= 0,0445$ , teste de *Mann-Whitney*, Tabela 12), desapareceu na condição K562 com bloqueio de MICA ( $p= ns$ , teste de *Mann-Whitney*, Tabela 15). O mesmo ocorreu para a intensidade de expressão de CD107a, para NK totais ( $p= 0,0233$ ) CD56<sup>dim</sup> ( $p= 0,0308$ ) e CD56<sup>bright</sup> ( $p= 0,0097$ ) (Tabela 12) na condição após estímulo com células K562; desapareceu a diferença de menor intensidade de expressão na EDT, em relação ao grupo CTR, na condição K562 com bloqueio de MICA ( $p= ns$ , teste de *Mann-Whitney*; Tabela 15).

*Ou seja, com bloqueio de MICA, não observamos diferenças significativas para CD107a entre os grupos EDT e CTR (Tabela 15), apesar de terem ocorrido diferenças na condição de estímulo com K562 sem bloqueio (Tabela 12).*

Todos os dados das análises individuais de mulheres dos grupos CTR e EDT, tanto para a frequência (%) como para a intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e

IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo com células K562, e com células K562 pós bloqueio para MICA, estão apresentados no Anexo X, Tabela 3.

**Tabela 15.** Comparação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e entre as suas intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, na condição de estímulo com K562 bloqueadas para a proteína MICA.

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (frequência de células com expressão, %)														
	CD107a					IFN $\gamma$					IL-10				
	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>
NK totais	21	16,8	19	17,3	ns	21	3,0	19	4,5	ns	17	-0,2	14	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	18,5	19	22,0	ns	21	3,1	19	4,4	ns	18	-0,1	14	0,3	<b>0,0067</b>
CD56 <sup>bright</sup>	16	17,3	17	24,1	ns	16	3,4	17	5,8	ns	13	-0,1	13	-0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	29,0	17	25,8	ns	20	1,8	17	3,1	ns	17	0,0	13	0,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	20,5	18	13,9	ns	20	6,0	18	5,0	ns	17	-0,1	14	0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	14,4	7	30,3	NA	4	6,4	7	0,9	NA	4	1,1	5	0,3	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	25,0	15	22,0	ns	16	3,3	14	8,9	<b>0,0275</b>	13	-0,6	11	0,0	ns

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN $\gamma$					IL-10				
	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>	EDT (n)	med	CTR (n)	med	<i>p</i>
NK totais	21	57,0	19	87,0	ns	21	0,5	19	18,0	<b>0,0084</b>	17	0,0	14	19,8	<b>0,0308</b>
CD56 <sup>dim</sup>	21	69,0	19	87,0	ns	21	2,1	19	20,1	<b>0,0128</b>	18	0,4	14	21,2	ns
CD56 <sup>bright</sup>	16	61,5	17	81,0	ns	16	-0,7	14	8,0	<b>0,0308</b>	13	-15,0	13	8,0	<b>0,0329</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	55,5	17	94,0	ns	20	-0,1	17	20,0	<b>0,0126</b>	17	0,0	13	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	121,5	18	83,0	ns	20	9,9	18	11,0	ns	17	-6,0	14	-2,5	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	54,5	7	99,0	NA	4	-5,4	7	6,4	NA	4	-6,0	6	9,8	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	70,5	15	157,0	ns	16	2,0	14	9,8	<b>0,0308</b>	13	-14,0	11	-12,0	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência; n: número de mulheres analisadas para cada subpopulação; K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor da maior mediana significativa entre os grupos EDT e CTR; ns: não significativa ( $p \geq 0,05$ ); NA: não analisado; valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### ❖ **Análise de correlação entre a expressão das moléculas envolvidas na atividade de células NK, após o estímulo com células K562 bloqueadas para MICA:**

As análises para avaliação da ocorrência ou não de correlação foram realizadas, tanto para a % como para a intensidade de expressão. Os valores de *p* e *r* foram determinados pelo teste de correlação de *Spearman* (Tabela 16):

► **Grupo CTR:** algumas correlações foram mantidas, outras perdidas, e novas surgidas, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA:

- **IFN- $\gamma$  e CD107a:** correlações positivas para % de expressão: mantiveram-se algumas correlações positivas para as populações celulares previamente encontradas na condição de estímulo com K562 sem bloqueio: NK totais ( $r=0,5$ ,  $p=0,0161$ ), CD56<sup>dim</sup>

( $r= 0,5$ ,  $p= 0,0169$ ), e  $CD56^{dim}CD16^{-}$  ( $r= 0,8$ ,  $p= 0,0001$ ) e surgiu outra,  $CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $r= 0,7$ ,  $p= 0,0088$ ).

- **IFN- $\gamma$  e IL-10:** correlações positivas para intensidade de expressão, nas subpopulações  $CD56^{bright}$  ( $r=0,6$ ,  $p=0,0381$ ) e  $CD56^{bright}CD16^{-}$  ( $r=0,8$ ,  $p=0,0027$ ) (correlações ausentes na condição K562 sem bloqueio).
  - **CD107a e IL-10:** correlação negativa para intensidade de expressão para a subpopulação  $CD56^{dim}CD16^{+}$  ( $r= -0,6$ ,  $p= 0,0485$ ) (correlação ausente na condição K562 sem bloqueio).
- **Grupo EDT:** algumas correlações foram mantidas, outras perdidas, e novas surgidas, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA:
- **IFN- $\gamma$  e IL-10:** para % expressão, nas subpopulações:  $CD56^{dim}$  ( $r=0,5$ ,  $p=0,0326$ ) (correlação positiva) e  $CD56^{bright}$  ( $r= -0,7$ ,  $p= 0,0182$ ) (correlação negativa) (não observadas com estímulo com K562 sem bloqueio). Para a intensidade de expressão: correlação positiva em NK totais ( $r=0,6$ ,  $p=0,0173$ ) (não observada sem bloqueio);  $CD56^{dim}$  ( $r=0,6$ ,  $p=0,0068$ ) e  $CD56^{bright}$  ( $r=0,7$ ,  $p= 0,0054$ ) (previamente observadas na condição com K562 sem bloqueio); as correlações  $CD56^{dim}CD16^{-}$  e  $CD56^{dim}CD16^{-}$  observadas na condição sem bloqueio, foram perdidas na condição de K562 bloqueada para MICA.
  - **CD107a e IFN- $\gamma$ :** para % de expressão, novas correlações positivas: em NK totais ( $r=0,4$ ,  $p= 0,0451$ ) e  $CD56^{dim}$  ( $r=0,5$ ,  $p= 0,0175$ ). Essas correlações também foram observadas no grupo CTR.

Na Tabela 16 estão apresentados os dados significantes de correlações observadas nos grupos EDT e CTR, tanto para a frequência como para a intensidade de produção das moléculas, em cada subpopulação de células NK.

**Tabela 16.** Análise de correlação entre as frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e entre suas intensidades de expressão, nas subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose (A) e controles (B), na condição após **estímulo com células K562 bloqueadas para MICA**.

A) Grupo endometriose

Estímulo com K562BLOQ (frequência de células com expressão, %)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	17	ns	ns	21	<b>0,0451</b>	<b>0,4</b>	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	<b>0,0326</b>	<b>0,5</b>	21	<b>0,0175</b>	<b>0,5</b>	18	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	13	<b>0,0182</b>	<b>-0,7</b>	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	17	<b>0,0173</b>	<b>0,6</b>	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	<b>0,0068</b>	<b>0,6</b>	21	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	13	<b>0,0054</b>	<b>0,7</b>	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns

B) Grupo controle

Estímulo com K562BLOQ (frequência de células com expressão, %)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	13	ns	ns	19	<b>0,0161</b>	<b>0,5</b>	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	14	ns	ns	19	<b>0,0169</b>	<b>0,5</b>	14	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	13	ns	ns	17	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	13	ns	ns	17	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	14	ns	ns	18	<b>0,0001</b>	<b>0,8</b>	14	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	5	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	11	ns	ns	14	<b>0,0088</b>	<b>0,7</b>	13	ns	ns
Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)									
Subpopulações	IFN- $\gamma$ x IL-10			IFN- $\gamma$ x CD107a			CD107a x IL-10		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	14	ns	ns	19	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	14	ns	ns	19	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup>	13	<b>0,0381</b>	<b>0,6</b>	17	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	13	ns	ns	17	ns	ns	13	<b>0,0485</b>	<b>-0,6</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	14	ns	ns	18	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>+</sup>	5	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>brigh</sup> CD16 <sup>-</sup>	11	<b>0,0027</b>	<b>0,8</b>	14	ns	ns	13	ns	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontando-se o valor basal (sem estímulo); n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de  $r$ ; em negrito e sublinhado: correspondem a correlações diferenciais entre os grupos EDT e CTR; as análises foram realizadas a partir de valores de mediana da porcentagem de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e de suas MFIs, nas diferentes subpopulações de NK; ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ); NA: não analisado; valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

#### 4.4.3 Expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e relação aos níveis de MICA solúvel

Uma vez que MICA solúvel pode diminuir a atividade citotóxica de células NK via ligação e internalização do receptor NKG2D, avaliamos a presença de correlação entre os níveis de MICA solúvel (sMICA) no soro (sistêmico) ou no fluido peritoneal (FP; no local da lesão) e a expressão das moléculas importantes na atividade efetora (CD107a, IFN- $\gamma$ ) e reguladora de células NK (IL-10) (% e intensidade) no grupo CTR e EDT. Esta análise foi realizada em células NK totais e suas subpopulações: CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, com ou sem a expressão da molécula CD16, também envolvida na citotoxicidade pelas células NK, mas via ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos). As análises foram realizadas para as condições: basal de cultura (sem estímulo), com estímulo de células K562 e com estímulo de células K562 bloqueadas para MICA (K562BLOQ).

Ressaltamos que não foi realizada a análise para a subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, em mulheres com EDT, uma vez que poucas amostras tiveram número de eventos igual ou maior ou de 100 (valor de corte para análise).

Todas as análises de correlação, com determinação de valores de  $r$  e  $p$ , foram realizadas pelo teste de correlação de *Spearman*.

##### 4.4.3.1 Moléculas vs MICA solúvel: na condição basal de cultura

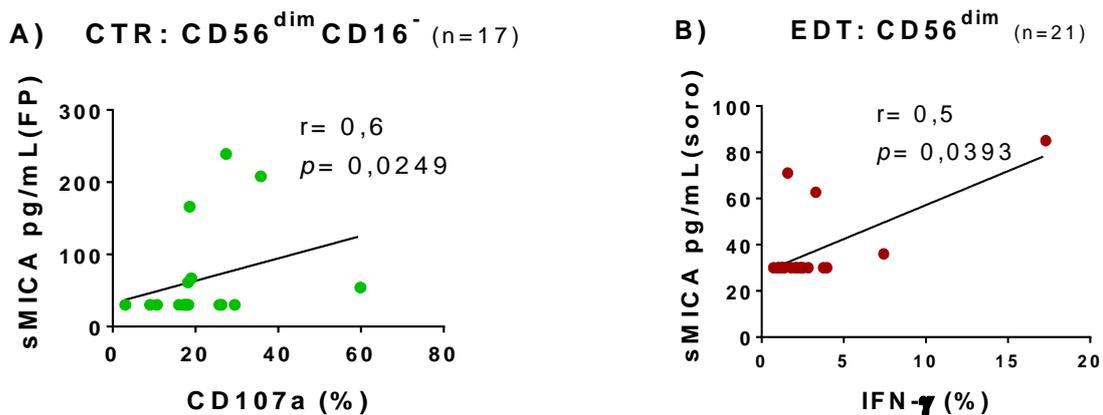
###### ► Grupo CTR:

- **CD107a e sMICA:** observamos duas correlações positivas:
  - i) % de células CD107a<sup>+</sup> e sMICA no fluido peritoneal, em células: NK totais ( $r=0,5$ ,  $p= 0,0316$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,6$ ,  $p= 0,0249$ ) (Figura 41).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA totais (negativos e positivos, no soro ou FP).
- **IL-10 e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de IL-10 e níveis de sMICA totais (soro ou FP).

► **Grupo EDT:**

- **CD107a e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de CD107a e níveis de sMICA (soro ou FP).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:** observamos correlação positiva (Figura 41):
  - i) % de células IFN- $\gamma$  + e níveis de sMICA no soro, nas subpopulações: CD56<sup>dim</sup> ( $r=0,5$ ,  $p= 0,0393$ ) e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r=0,5$ ,  $p= 0,0277$ )
- **IL-10 e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de IL-10 e níveis de sMICA (soro ou FP).

Os dados significantes das análises de correlação entre a frequência de células positivas ou entre a intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 com níveis de sMICA (soro e FP) estão no Anexo X, Tabela 4.



**Figura 41. Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas e expressão de moléculas de atividade efetora de células NK, em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel de mulheres com endometriose e controles, na condição basal de cultura, sem estímulo. A)** correlação entre as frequências de expressão de CD0107 e níveis de sMICA em fluido peritoneal, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, no grupo CTR; **B)** correlação entre as frequências de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA no soro, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, no grupo EDT; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; FP: fluido peritoneal; n: número de pares de dados analisados; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

#### 4.4.3.2 Moléculas vs MICA solúvel: na condição de estímulo com células K562

► **Grupo CTR:**

- **CD107a e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de CD107a com estímulo com células K562 e níveis de sMICA do grupo total de positivos e negativos (soro ou FP).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:** observamos duas correlações negativas:
  - i) **% de células IFN- $\gamma$  + e níveis de sMICA no FP**, na subpopulação CD56<sup>bright</sup> ( $r=-0,7$ ,  $p= 0,0032$ ) (Figura 42).
  - ii) **intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA no soro**, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=-0,7$ ,  $p= 0,014$ ).
- **IL-10 e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de IL-10 com estímulo com células K562 e níveis de sMICA do grupo total de positivos e negativos (soro ou FP).

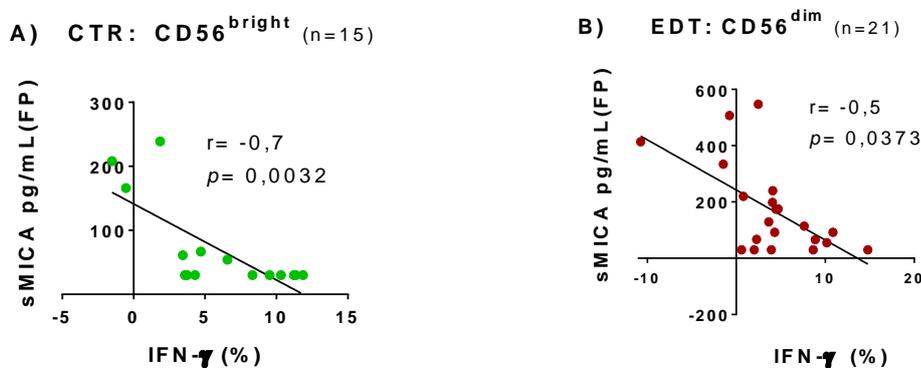
Os dados das análises de correlação estão apresentados no Anexo X, Tabela 5A.

► **Grupo EDT:**

Também na endometriose, observamos diversas correlações negativas, sendo apenas uma semelhante àquelas observadas no grupo CTR (Figura 42, e Anexo X, Tabela 5B):

- **CD107a e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de CD107a com estímulo com células K562 e níveis de sMICA do grupo total de positivos e negativos (soro ou FP).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:** observamos correlações negativas:
  - i) **% de células IFN- $\gamma$ + e níveis de sMICA no soro**, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r= -0,5$ ,  $p= 0,0413$ ) (semelhante ao grupo CTR, na mesma subpopulação, mas para MFI)
  - ii) **% de células IFN- $\gamma$ + e níveis de sMICA no FP**, nas populações (correlações negativas não observadas no grupo CTR):
    - NK totais ( $r= -0,5$ ,  $p= 0,0279$ ),
    - CD56<sup>dim</sup> ( $r= -0,5$ ,  $p= 0,0373$ ),
    - CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> ( $r= -0,5$ ,  $p= 0,0468$ )
    - CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup> ( $r= -0,6$ ,  $p= 0,0076$ )
  - iii) **intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA no FP**, nas subpopulações (correlações negativas não observadas no grupo CTR):
    - CD56<sup>dim</sup> ( $r= -0,4$ ,  $p=0,0434$ )
    - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r= -0,5$ ,  $p=0,0488$ )
    - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r= -0,5$ ,  $p=0,0435$ )

- **IL-10 e sMICA:** não foram encontradas correlações entre a expressão (% e MFI) de IL-10 com estímulo com células K562 e níveis de sMICA do grupo total de positivos e negativos (soro ou FP) ( $p \geq 0,05$ , correlação de *Spearman*).



**Figura 42. Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas para a expressão de IFN- $\gamma$  em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e de controles, na condição com estímulo com células K562. A)** correlação entre as frequências de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA em fluido peritoneal (FP), na subpopulação CD56<sup>bright</sup>, em CTRs; **B)** correlação entre as frequências de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA no FP, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>, no grupo EDT; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; n: número de pares de dados analisados; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

#### 4.4.3.3 Moléculas vs MICA solúvel: na condição estímulo com células K562 bloqueadas para MICA

Observamos que, após o estímulo com células K562 bloqueadas para MICA (K562BLOQ), algumas correlações foram mantidas em relação à condição de estímulo com K562 sem bloqueio. Destacamos também, que novas correlações foram detectadas na presença de K562BLOQ, que representa a presença de MICA solúvel.

##### ► Grupo CTR:

Foram observadas tanto correlações positivas como negativas (Figura 43 e Anexo X, Tabela 6):

- **CD107a e sMICA:** observamos correlação positiva:
  - i) % de células CD107a+ e níveis sMICA no FP, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = 0,8$ ,  $p = 0,0476$ ) (correlação positiva não encontrada na condição com estímulo de K562 sem bloqueio para MICA) (Correlação de *Spearman*).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:** observamos correlação negativa:

- ii) **intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  e níveis sMICA no soro**, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,7$ ,  $p = 0,0152$ ) (correlação negativa, semelhante à encontrada na condição com estímulo de K562 sem bloqueio) (Correlação de Spearman).
- **IL-10 e sMICA:** observamos correlações negativas:
- iii) **de células IL-10+ e níveis de MICA no soro**, para as subpopulações:
- CD56<sup>dim</sup> ( $r = -0,6$ ,  $p = 0,0175$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = -0,6$ ,  $p = 0,0455$ ) (correlação negativa não encontrada na condição com estímulo de K562 sem bloqueio para MICA) (Correlação de Spearman).
- iv) **intensidade de expressão de IL-10 e níveis de sMICA no soro**, para as subpopulações (correlações negativas, ausentes com estímulo de K562 sem bloqueio) (Correlação de Spearman):
- NK totais ( $r = -0,7$ ,  $p = 0,0105$ )
  - CD56<sup>dim</sup> ( $r = -0,7$ ,  $p = 0,0152$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = -0,6$ ,  $p = 0,0417$ )
  - CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,7$ ,  $p = 0,0012$ )

► **Grupo EDT:** foram observadas apenas correlações negativas (Figura 43 e Anexo X, Tabela 6)

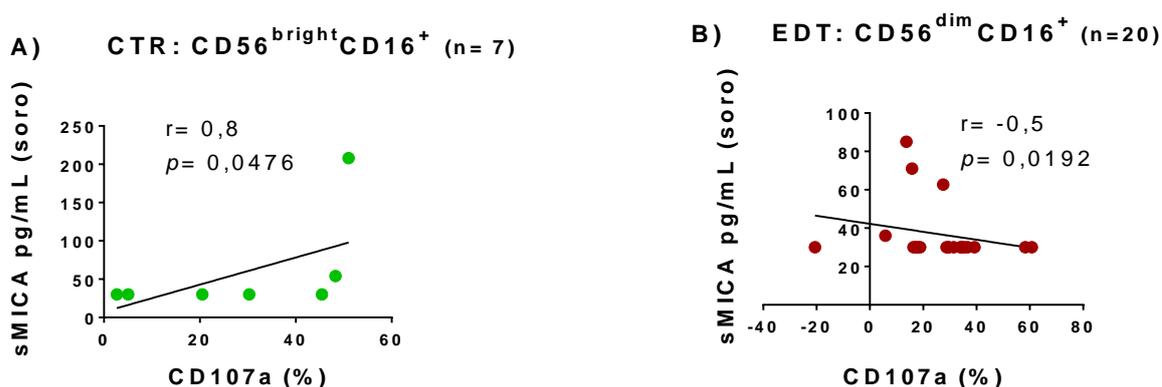
- **CD107a e sMICA:**
  - i) **% de células CD107a+ e níveis de MICA no soro**, para a subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0192$ ) (correlação negativa não encontrada na condição com estímulo de K562 sem bloqueio para MICA) (Correlação de Spearman).
  - ii) **intensidade de expressão de CD107a e níveis de sMICA no soro**, em células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0390$ ) (correlação negativa não observada no estímulo de K562 sem bloqueio, e não encontrada no grupo CTR) (Correlação de Spearman).
  - iii) **intensidade de expressão de CD107a e níveis de sMICA no FP**, em células CD56<sup>bright</sup> ( $r = -0,7$ ,  $p = 0,0057$ ) (correlação negativa não observada no estímulo de K562 sem bloqueio, e não encontrada no grupo CTR) (Correlação de Spearman).
- **IFN- $\gamma$  e sMICA:**

i) % de células IFN- $\gamma$ + e níveis de sMICA no soro, em células NK totais ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0366$ ) (semelhante àquela encontrada na condição com estímulo com K562 sem bloqueio, mas foi para células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>; correlação negativa não encontrada no grupo CTR)

ii) % de células IFN- $\gamma$ + e níveis de sMICA no FP, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0444$ ) (semelhante ao encontrado na condição com estímulo com K562 sem bloqueio, mas com perda de correlação para células NK totais, CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>; correlação negativa não encontrada no grupo CTR) (Correlação de *Spearman*).

- **IL-10 e sMICA:**

iii) % de células IL-10+ e níveis de sMICA no soro, na subpopulação CD56<sup>dim</sup> ( $r = -0,5$ ,  $p = 0,0427$ ) (correlação negativa não observada no estímulo de K562 sem bloqueio; mas semelhante a encontrada no grupo CTR)



**Figura 43. Análise de correlação entre a frequência (%) de células positivas para a expressão CD107a em subpopulações de células NK circulantes, com níveis de MICA solúvel de mulheres com endometriose e de controles, na condição após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA. A) correlação entre as frequências de expressão de CD107a e níveis de sMICA no soro, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, em CTRs; B) correlação entre as frequências de expressão de CD107a e níveis de sMICA no soro, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, no grupo EDT; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; sMICA: MICA solúvel; FP: fluido peritoneal; n: número de pares de dados analisados; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.**

Na Tabela 17, apresentamos um balanço dos principais resultados da correlação entre a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e os níveis de MICA solúvel, no soro e no fluido peritoneal.

**Tabela 17. Balanço dos principais resultados da correlação entre a expressão de moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e níveis de MICA solúvel.**

Condição basal de cultura, sem estímulo																
CONTROLES								ENDOMETRIOSE								
% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	
<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				
NK totais	FP	<b>0.5</b>	<b>0,0316</b>		soro e FP	SC			soro e FP	<b>SC</b>			soro e FP	SC		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	FP	<b>0.6</b>	<b>0,0249</b>													
<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				
	soro e FP	SC			soro e FP	SC			soro	<b>0.5</b>	<b>0,0393</b>		soro e FP	SC		
								CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>0.5</b>	<b>0,0277</b>					
<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				
	soro e FP	SC			soro e FP	SC			soro e FP	SC			soro e FP	SC		
Estímulo com células K562																
CONTROLES								ENDOMETRIOSE								
% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	
<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				
	soro e FP	SC			soro e FP	SC			soro e FP	SC			soro e FP	SC		
<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				
CD56 <sup>bright</sup>	FP	<b>-0.7</b>	<b>0,0032</b>		CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.7</b>	<b>0,0140</b>								
								NK totais	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0279</b>		CD56 <sup>dim</sup>	FP	<b>-0.4</b>	<b>0,0434</b>
								CD56 <sup>dim</sup>	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0373</b>		CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0488</b>
								CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0076</b>		CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0435</b>
								CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	FP	<b>-0.6</b>	<b>0,0076</b>					
								CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.5</b>	<b>0,0413</b>					
<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	soro	<b>-0.6</b>	<b>0,019</b>			soro e FP	SC		soro e FP	<b>SC</b>			soro e FP	SC		
Estímulo com células K562BLOQ																
CONTROLES								ENDOMETRIOSE								
% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	% células	sMICA	r	p	MFI	sMICA	r	p	
<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				<b>CD107a</b>				
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	FP	<b>0.8</b>	<b>0,0476</b>		soro e FP	SC										
								CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.5</b>	<b>0,0192</b>		CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.5</b>	<b>0,0390</b>
													CD56 <sup>bright</sup>	FP	<b>-0.7</b>	<b>0,0057</b>
<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				<b>IFN-γ</b>				
	soro e FP	SC			CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.7</b>	<b>0,0152</b>					soro e FP	<b>SC</b>		
								NK totais	soro	<b>-0.5</b>	<b>0,0366</b>					
								CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	FP	<b>-0.5</b>	<b>0,0444</b>					
<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				<b>IL-10</b>				
CD56 <sup>dim</sup>	soro	<b>-0.6</b>	0,0175		NK totais	soro	<b>-0.7</b>	<b>0,0105</b>					soro e FP	<b>SC</b>		
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	soro	<b>-0.6</b>	0,0455		CD56 <sup>dim</sup>	soro	<b>-0.7</b>	<b>0,0152</b>		CD56 <sup>dim</sup>	soro	<b>-0.5</b>	0,0427			
					CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	soro	<b>-0.6</b>	<b>0,0417</b>								
					CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	soro	<b>-0.7</b>	<b>0,0012</b>								

NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; sMICA: MICA solúvel; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; FP: fluido peritoneal; em negrito e sublinhado: correlações diferenciais entre o grupo EDT e CTR; em vermelho: correlações positivas; em azul: correlações negativas; SC: sem correlação; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de p e r determinados pelo teste de correlação de Spearman.

**Resumo do balanço dos principais resultados** da correlação entre a **expressão de moléculas** envolvidas na atividade efetora de células NK e **níveis de MICA solúvel**:

*Na condição basal, sem estímulo, mulheres do grupo CTR tiveram correlações positivas entre a % CD107a e níveis de sMICA no FP e entre a intensidade de expressão de IFN- $\gamma$ . Diferentemente do grupo CTR, apenas na EDT houve correlação positiva entre a % de IFN- $\gamma$  e níveis de sMICA no soro. Na condição de estímulo com células K562, tanto mulheres do grupo CTR como do grupo EDT apresentaram correlações negativas para a expressão de IFN- $\gamma$  (% e intensidade) e níveis de sMICA no soro e FP. No entanto, mulheres com EDT apresentaram correlações negativas em um maior número de subpopulações celulares, algumas ausentes no grupo CTR, e também ausentes na condição sem estímulo. No entanto, a presença do bloqueio de células K562 para MICA resultou em novas correlações negativas, tanto entre a % de células produtoras de IL-10 como para a intensidade de expressão, e níveis de sMICA no soro, em ambos os grupos, CTR e EDT. Tais correlações estiveram ausentes na condição de estímulo sem bloqueio de MICA (exceto para % de células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) e na condição basal de cultura (sem estímulo).*

#### **4.4.4 Expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e relação com estádios da endometriose**

A expressão de moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 (frequência e intensidade-MFI) por células NK e subpopulações foi analisada em relação aos estádios da EDT, iniciais (I e II) e avançados (III e IV) e, destes, em relação ao grupo CTR. A análise foi realizada na condição basal de cultura (sem estímulo), e com estímulo de células K562 com e sem bloqueio, para células NK totais e suas subpopulações. Para todas as análises comparativas entre os grupos usamos o teste de *Mann-Whitney*.

A subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> de mulheres com EDT não foi analisada, pois poucas amostras atingiram o valor de corte ( $\geq 100$  eventos na aquisição do citômetro).

##### **4.4.4.1 Moléculas vs estádios: na condição basal de cultura**

- **CD107a:** não houve diferença na frequência de células produtoras entre EDT inicial e avançada e nem entre EDT inicial e CTR (Figura 44). No entanto, observamos uma menor intensidade de expressão na EDT avançada vs EDT inicial (na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p= 0,0368$ ) (Tabela 18A). Na comparação entre EDT inicial e CTR, não foi observada diferença na % expressão (Figura 44), mas houve maior intensidade de expressão na EDT em células NK totais ( $p= 0,0238$ ) e na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p= 0,0293$ ) (Tabela 18B). Na análise entre EDT avançada vs CTR, observamos menor % de expressão de células produtoras de CD107a na EDT avançada, para a subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0445$ ) (Figura 44) bem

como menor intensidade de expressão nessa mesma subpopulação celular ( $p= 0,0185$ ), descrita como de maior propriedade citotóxica, na EDT avançada (Tabela 18C).

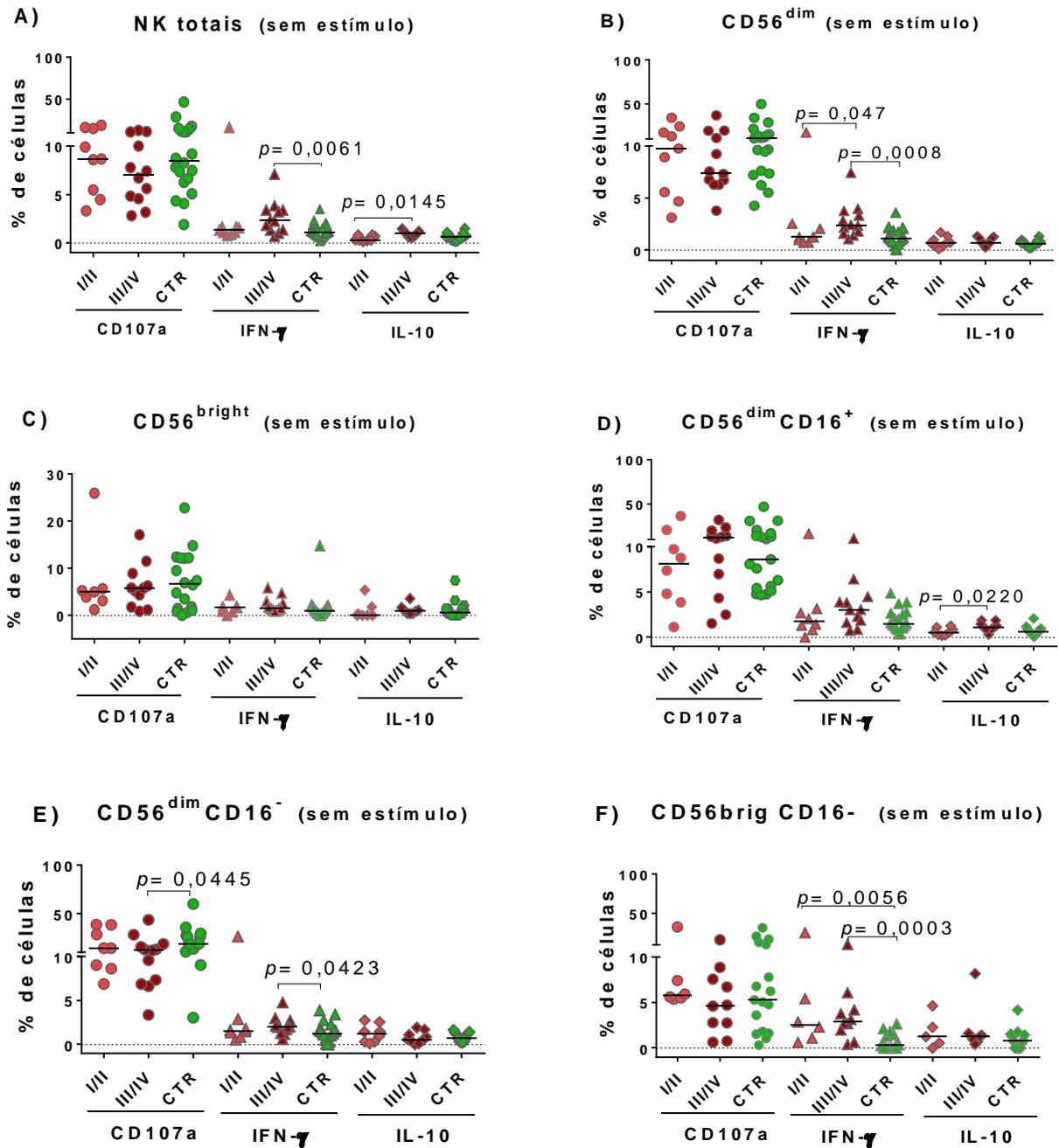
*Em resumo, na EDT avançada há menor expressão de CD107a, na % ou intensidade, mesmo na ausência de estímulo in vitro, principalmente, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>.*

- **IFN- $\gamma$** : maior frequência de células produtoras na EDT avançada vs EDT inicial (CD56<sup>dim</sup>,  $p=0,047$ ) (Figura 44), mas sem diferença para intensidade de expressão, em qualquer subpopulação celular (Tabela 18A). Na comparação entre EDT inicial e CTR, mulheres com EDT inicial apresentaram maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p=0,0056$ ) (Figura 44), mas não apresentaram diferenças para intensidade de expressão (Tabela 18B). Para EDT avançada vs CTR, mulheres com EDT avançada apresentaram maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  (NK totais,  $p=0,0061$ ; CD56<sup>dim</sup>,  $p=0,0008$ ; CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p= 0,0423$  e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p=0,0003$ ) (Figura 44) e maior intensidade de expressão na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0163$ ) (Tabela 18C).

*Em contraste com CD107a, a expressão de IFN- $\gamma$  nas células NK foi, em geral, maior na EDT avançada, ora na sua % ora na sua intensidade de expressão, ou ambas, seja na comparação com o grupo EDT inicial ou grupo CTR. Algumas dessas diferenças foram em relação às células NK totais, às CD56<sup>dim</sup> e às CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>.*

- **IL-10**: maior frequência de células com expressão na EDT avançada, em comparação à inicial (em células NK totais,  $p=0,0145$  e na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>,  $p=0,022$ ) (Figura 44), mas sem diferença para a intensidade de expressão (Tabela 18A). Entre o grupo EDT inicial e grupo CTR, não houve diferença na frequência de células produtoras (Figura 44), mas houve maior intensidade de expressão na EDT inicial, em várias subpopulações celulares (em NK totais,  $p= 0,0198$ , CD56<sup>dim</sup>,  $p= 0,0437$  e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>,  $p= 0,0238$ ) (Tabela 18B). Essa maior intensidade de marcação para IL-10 em células NK totais e CD56<sup>dim</sup>, já havia sido observada na comparação entre o grupo total de mulheres com EDT e CTR, independentemente do estágio da doença (como descrito no item 4.4.2.1). Na comparação entre o grupo EDT avançada e grupo CTR, assim como para EDT inicial, não foi observada qualquer diferença na frequência de células produtoras de IL-10 (Figura 44). No entanto, houve uma maior intensidade de expressão de IL-10 na EDT avançada, na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p= 0,0434$ ) (Tabela 18C).

*A expressão de IL-10 nas células NK, na condição basal de cultura, segue um padrão mais semelhante à molécula IFN- $\gamma$ . Ou seja, de modo geral, detectamos maior expressão de IL-10 (% ou intensidade de expressão) no estágio avançado da doença, tanto para células NK totais como para algumas subpopulações CD56<sup>dim</sup>.*



**Figura 44. Comparação da porcentagem (%) de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.** CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; sem estímulo: condição basal de cultura; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; linha pontilhada: indica o valor de zero para a % de células; as barras horizontais representam as medianas de porcentagem de expressão de cada molécula; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 18.** Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e entre controles, **na condição basal de cultura, sem estímulo.**

A) EDT inicial vs EDT avançada

Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	I/II		III/IV			I/II		III/IV			I/II		III/IV		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	9	361,0	12	336,0	ns	9	105,0	12	77,6	ns	8	130,5	9	97,4	ns
CD56 <sup>dim</sup>	9	356,0	12	331,0	ns	9	101,0	12	77,3	ns	9	125,0	9	93,7	ns
CD56 <sup>bright</sup>	7	475,0	11	463,0	ns	7	155,0	11	70,8	ns	7	168,0	8	133,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	349,5	12	341,5	ns	8	109,9	12	76,3	ns	8	8,9	9	123,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	342,5	12	278,0	<b>0,0368</b>	8	127,0	12	78,7	ns	8	147,5	9	129,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	480,0	10	454,0	ns	6	122,30	10	69,0	ns	5	169,0	8	144,0	ns

B) EDT inicial vs CTRs

Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	I/II		CTR			I/II		CTR			I/II		CTR		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	9	361,0	20	336,0	<b>0,0238</b>	9	105,0	20	97,2	ns	8	130,5	16	49,1	<b>0,0198</b>
CD56 <sup>dim</sup>	9	356,0	20	327,5	ns	9	101,0	20	99,4	ns	9	125,0	16	37,0	<b>0,0437</b>
CD56 <sup>bright</sup>	7	475,0	18	452,0	ns	7	155,0	18	92,6	ns	7	168,0	16	131,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	349,5	19	322,0	<b>0,0293</b>	8	109,9	19	93,3	ns	8	8,9	16	3,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	342,5	19	340,0	ns	8	127,0	19	122,0	ns	8	147,5	16	139,0	<b>0,0238</b>
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	9	NA	NA	1	NA	9	NA	NA	1	NA	8	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	480,0	17	438,0	ns	6	122,3	15	1,0	ns	5	169,0	13	143,0	ns

C) EDT avançada vs CTRs

Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	III/IV		CTR			III/IV		CTR			III/IV		CTR		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	12	336,0	20	336,0	ns	12	77,55	20	97,2	ns	9	97,4	16	49,1	ns
CD56 <sup>dim</sup>	12	331,0	20	327,5	ns	12	77,3	20	99,4	ns	9	93,7	16	37,0	ns
CD56 <sup>bright</sup>	11	463,0	18	452,0	ns	11	70,8	18	92,6	ns	8	133,0	16	131,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	12	341,5	19	322,0	ns	12	76,3	19	93,3	ns	9	123,0	16	3,0	<b>0,0434</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	12	278,0	19	340,0	<b>0,0185</b>	12	78,7	19	122,0	ns	9	129,0	16	139,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	9	NA	NA	3	NA	9	NA	NA	3	NA	8	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	454,0	17	438,0	ns	10	69,0	15	104,0	<b>0,0163</b>	8	144,0	13	143,0	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose, III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de  $p$  significantes na comparação entre os grupos; em vermelho: valor da maior mediana significante na comparação entre os grupos; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.4.4.2 Moléculas vs estádios: na condição de estímulo com células K562

- **CD107a:** o estímulo com K562 induziu um aumento na % de células produtoras de CD107a, em ambos os estádios da EDT (iniciais e avançados). No entanto, houve uma **menor frequência** de células produtoras de CD107a nos **estádios avançados, na comparação com estádios iniciais** ( $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p=0,0055$ ) (Figura 45) e **menor intensidade de expressão** ( $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p=0,0068$ ) (Tabela 19A).

A análise entre mulheres do grupo EDT inicial e o grupo CTR não mostrou diferenças significativas, tanto para a frequência como para a intensidade de expressão da molécula CD107a, nas diferentes subpopulações de células NK avaliadas (Figura 45 e Tabela 19B). Na comparação entre **EDT avançada e CTRs**, mulheres em **estádios avançados apresentaram menor frequência** de células produtoras de CD107a (NK totais,  $p=0,0332$  e nas subpopulações  $CD56^{dim}CD16^-$ ,  $p=0,0116$  e  $CD56^{bright}CD16^-$ ,  $p=0,0404$ ) (Figura 45). Além disso, mulheres com **EDT avançada** também apresentaram **menor intensidade de expressão em relação ao grupo CTR** (NK totais,  $p=0,0043$ ,  $CD56^{dim}$ ,  $p=0,0065$ ,  $CD56^{bright}$ ,  $p=0,0097$  e  $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p=0,0044$ ) (Tabela 19C).

*Em resumo, o estímulo com células K562 não alterou a menor expressão (% e intensidade) da molécula CD107a na EDT avançada, tanto em relação à EDT inicial como para o grupo CTR saudável, mantendo-se semelhante à condição basal, sem estímulo. Essa menor expressão ocorreu, principalmente, em células  $CD56^{dim}$ .*

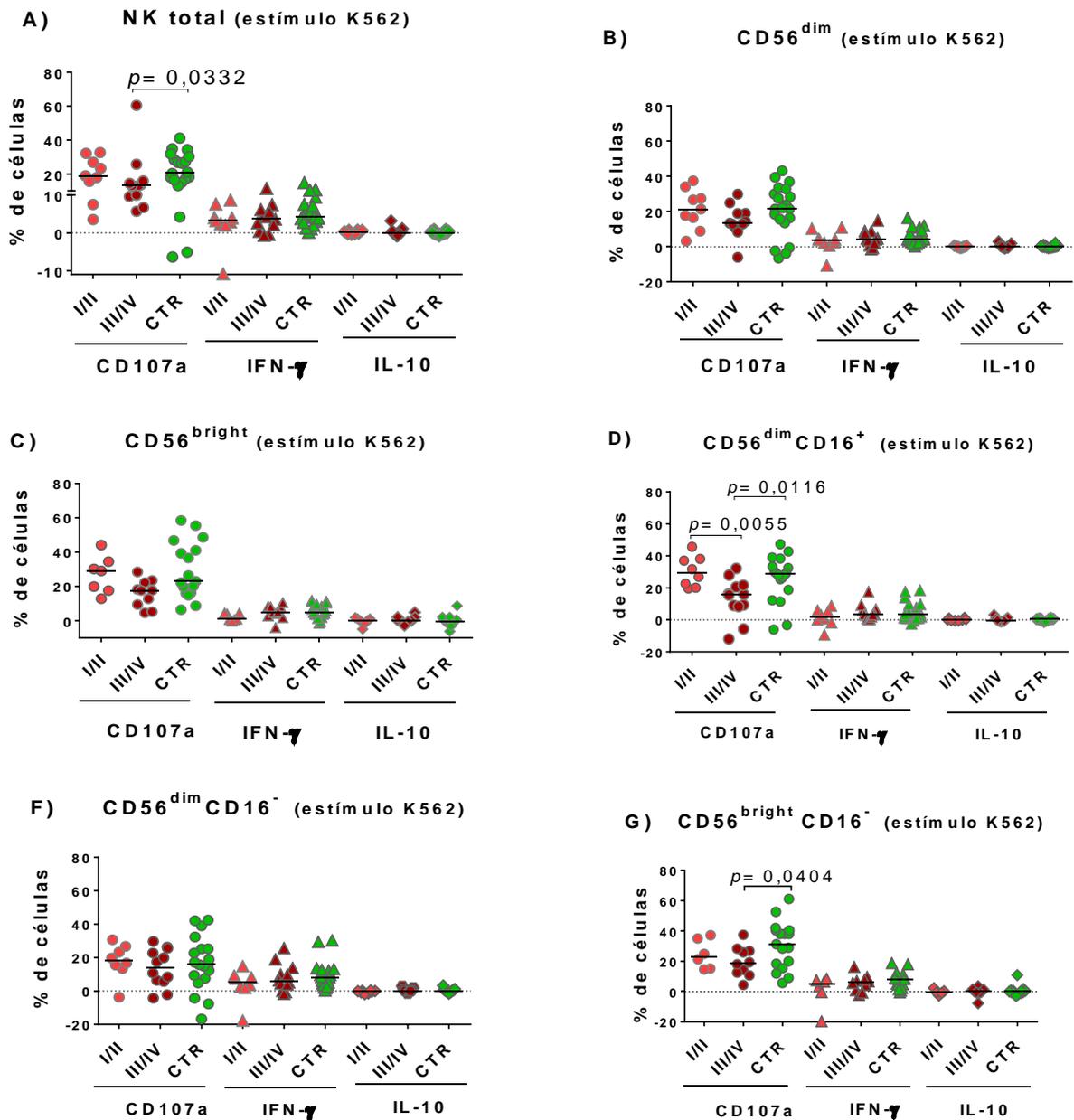
- **IFN- $\gamma$ :** na comparação entre a **EDT inicial e avançada**, não foi observada **nenhuma diferença** significativa, tanto para a frequência (%) como para a intensidade de expressão, em nenhuma subpopulação celular. No entanto, **entre EDT inicial e o grupo CTR**, na condição com o estímulo com células K562, observamos uma **menor intensidade de expressão na EDT inicial**, em células NK totais ( $p= 0,0308$ ),  $CD56^{bright}$  ( $p= 0,0019$ ) e  $CD56^{bright}CD16^-$  ( $p= 0,0184$ ) (Tabela 19B). Também, mulheres com **EDT avançada** apresentaram **menor intensidade de expressão em relação ao grupo CTR** ( $CD56^{bright}$ ,  $p= 0,0203$  e  $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p= 0,0420$ ) (Tabela 19C). Ou seja, para as células  $CD56^{bright}$ , a menor intensidade de expressão de IFN- $\gamma$ , ocorreu tanto em estádios iniciais quanto aos avançados da endometriose, na comparação com CTRs.

*Considerando esses resultados de forma integrada, podemos dizer que, apesar de observamos maior expressão de IFN- $\gamma$  na EDT, principalmente, na EDT avançada, na condição basal (sem estímulo), quando as células NK são estimuladas in vitro com células K562, tanto mulheres com EDT inicial como EDT avançada, apresentam menor expressão do que mulheres do grupo CTR, em células  $CD56^{bright}$  e  $CD56^{dim}$ .*

- **IL-10:** **não foram observadas diferenças** (%), (Figura 45 e MFI, Tabela 19A) entre mulheres em **EDT inicial e avançada**, nem entre **EDT avançada e o grupo CTR**, nas

diferentes subpopulações de NK. Porém, após estímulo com células K562, apesar dos baixos valores em ambos os grupos, foi observada uma **menor intensidade** de expressão em **estádios iniciais da EDT, na comparação com mulheres CTRs** (Tabela 19B) ( $CD56^{bright}$ ,  $p=0,0042$  e  $CD56^{bright}CD16^{-}$ ,  $p=0,0430$ ).

De forma geral, podemos considerar que a maior expressão de IL-10 em células NKs na EDT avançada, observada na condição basal de cultura, deixou de existir após o estímulo com células K562, mantendo-se tanto em relação à EDT inicial como aos CTRs saudáveis.



**Figura 45. Comparação da porcentagem de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição com estímulo com células K562.** CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; NK totais: incluem as subpopulações  $CD56^{dim}CD16^{+}$ ,  $CD56^{dim}CD16^{-}$ ,  $CD56^{bright}CD16^{+}$ ,  $CD56^{bright}CD16^{-}$ ,  $CD56^{-}CD16^{+}$ ; estímulo K562: estímulo com células K562; linha pontilhada: indica o valor de zero para % de células; as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão de cada molécula; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 19.** Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, **na condição de estímulo com células K562.**

A) EDT inicial vs EDT avançada

Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	I/II		III/IV			I/II		III/IV			I/II		III/IV		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	9	86,0	12	49,5	ns	9	-5,1	12	-2,9	ns	8	-6,5	9	9,6	ns
CD56 <sup>dim</sup>	9	88,0	12	42,5	ns	9	-4,2	12	2,9	ns	9	0,0	9	2,8	ns
CD56 <sup>bright</sup>	7	44,0	10	58,5	ns	7	-18	10	0,1	ns	7	-41,0	8	-5,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	<b>71,0</b>	12	36,0	<b>0,0068</b>	8	0,25	12	-3,2	ns	8	0,0	9	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	126,5	12	79,5	ns	8	2,65	12	9,7	ns	8	-12,5	9	-12,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	84,0	10	60,5	ns	6	-9,85	10	2,0	ns	5	-19,0	8	-1,5	ns

B) EDT inicial vs CTRs

Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	I/II		CTR			I/II		CTR			I/II		CTR		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	9	86,0	20	98,5	ns	9	-5,1	20	<b>14,8</b>	<b>0,0308</b>	8	-6,5	16	4,7	ns
CD56 <sup>dim</sup>	9	88,0	20	95,5	ns	9	-4,2	20	15,6	ns	9	0	16	1,51	ns
CD56 <sup>bright</sup>	7	44,0	17	102,0	ns	7	-18,0	17	<b>13,3</b>	<b>0,0019</b>	7	-41,0	14	<b>1,5</b>	<b>0,0042</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	71,0	18	75,5	ns	8	0,3	18	17,0	ns	8	0,0	16	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	126,5	19	106,0	ns	8	2,7	19	14,0	ns	8	-12,5	15	-5,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	8	NA	NA	1	NA	8	NA	NA	1	NA	7	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	84,0	17	115,0	ns	6	-9,9	15	<b>10,1</b>	<b>0,0184</b>	5	-19,0	13	<b>-4,0</b>	<b>0,0430</b>

C) EDT avançada vs CTRs

Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)														
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10				
	III/IV		CTR			III/IV		CTR			III/IV		CTR		
	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$	(n)	med	(n)	med	$p$
NK totais	12	49,5	20	<b>98,5</b>	<b>0,0043</b>	12	3,0	20	14,8	ns	9	9,6	16	4,7	ns
CD56 <sup>dim</sup>	12	42,5	20	<b>96,5</b>	<b>0,0065</b>	12	2,9	20	15,6	ns	9	2,8	16	1,5	ns
CD56 <sup>bright</sup>	10	58,5	17	<b>102,0</b>	<b>0,0097</b>	10	0,1	17	<b>13,3</b>	<b>0,0203</b>	8	-5,4	14	1,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	12	36,0	18	<b>75,5</b>	<b>0,0044</b>	12	-3,3	18	<b>17,0</b>	<b>0,0420</b>	9	0,0	16	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	12	79,5	19	106,0	ns	12	9,7	19	14,0	ns	9	-12,0	15	-5,0	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	8	NA	NA	3	NA	8	NA	NA	3	NA	7	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	60,5	17	115,0	ns	10	2,0	15	10,1	ns	8	-1,5	13	-4,0	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562: estímulo com células K562 descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de  $p$  significantes na comparação entre os grupos; em vermelho: valor da maior mediana significativa na comparação entre os grupos; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.4.4.3 Expressão de moléculas vs estádios: na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA

O estímulo na presença de bloqueio de MICA na superfície celular das células K562, representando a presença de MICA solúvel, de forma geral, não levou a diferenças na % de células com expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas diferentes subpopulações de células NK (Figura 46). Analisando diferenças em relação aos estádios da doença, destacamos:

- **CD107a:** houve **menor intensidade de expressão** de CD107a na **EDT avançada, em relação à EDT inicial**, em células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p=0,0266$ ) sem nenhuma outra diferença para as demais subpopulações (Tabela 20A).

Na comparação entre **EDT inicial e CTRs**, o estímulo com células K562 bloqueadas, assim como ocorreu no estímulo com K562 sem bloqueio, **não mostrou diferenças** (% de células e MFI) para CD107a (Figura 46 e Tabela 20B). Também **não houve diferença entre EDT avançada e CTRs**, tanto para % de células (Figura 46) como para intensidade de expressão (Tabela 20C), deixando de existir as diferenças existentes na condição com estímulo de células K562 sem bloqueio (Figura 43 e Tabela 19C).

*Em resumo, com o estímulo de células K562 bloqueadas para MICA na superfície celular houve perda da diferença de menor % de expressão na EDT avançada, em relação à EDT inicial e CTRs, observada com estímulo de célula K562 sem bloqueio. No entanto, mesmo na presença de bloqueio, foi mantida a menor intensidade de expressão de CD107a na EDT avançada em relação à inicial, mantendo-se semelhante à condição basal e com estímulo de células K562 sem bloqueio.*

- **IFN- $\gamma$ :** da mesma forma como observado na condição com estímulo de células K562 sem bloqueio (Figura 45 e Tabela 19A), na presença de bloqueio para MICA na superfície celular, **não foram observadas diferenças entre EDT inicial e avançada** (frequência, %, Figura 46, e MFI, Tabela 20A). Na comparação entre **EDT inicial e CTRs**, foi observada uma **menor % de células produtoras de IFN- $\gamma$  na EDT inicial**, em células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p=0,0326$ ) (Figura 46) e, assim como ocorreu com estímulo de K562 sem bloqueio, uma **menor MFI**, em NK totais ( $p=0,0491$ ) (Tabela 20B), **na EDT inicial**. Observamos também que, com o bloqueio, houve **perda da diferença da maior intensidade** de expressão em células CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> **nos CTRs com estímulo de K562 em relação à EDT inicial** ( $p=0,0019$  e  $p=0,0184$ , respectivamente; Tabela 19B, com estímulo sem bloqueio (Tabela 20B). No entanto, **a maior MFI observada no grupo CTR** após estímulo com células K562 sem bloqueio, em NK totais ( $p=0,0308$ ), **foi mantida em relação à EDT inicial, mesmo na presença de bloqueio** de MICA na superfície celular ( $p=0,0491$ ) (Tabela 20B).

Na comparação entre **EDT avançada e CTRs**, observamos **menor MFI na EDT avançada** (NK totais,  $p=0,0220$  e em CD56<sup>dim</sup>,  $p=0,0248$ ) (Tabela 20C), diferenças essas

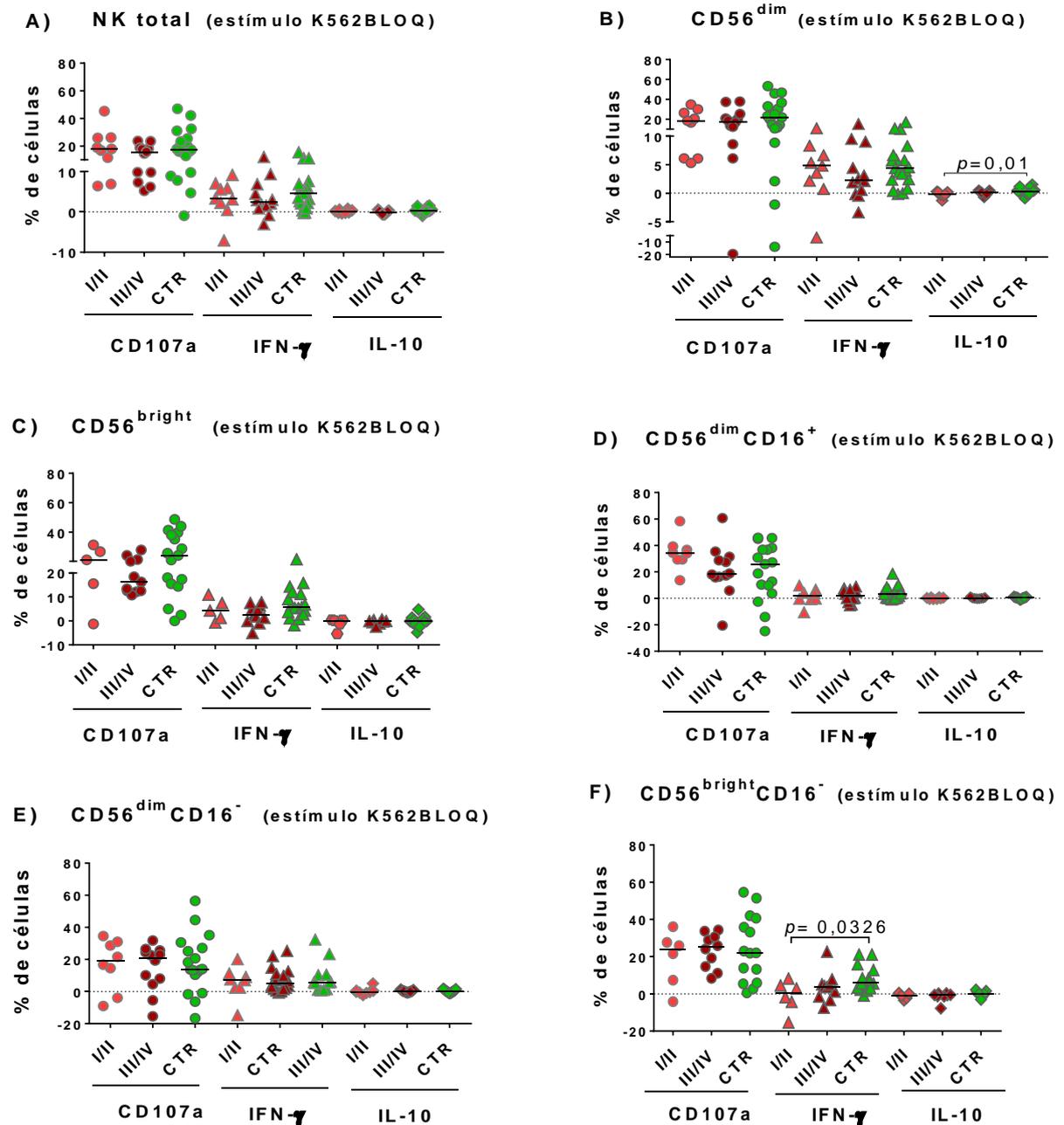
não observadas com o estímulo com K562 sem bloqueio (Tabela 20C). Além, disso, as diferenças previamente observadas para MFI, com K562 sem bloqueio ( $CD56^{bright}$ ,  $p= 0,0203$ , e  $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p= 0,0420$ ), foram mantidas com células K562 bloqueadas para MICA ( $CD56^{bright}$ ,  $p= 0,0060$  e  $CD56^{dim}CD16^+$ ,  $p= 0,0349$ ) (Tabela 20C).

*De forma geral, o bloqueio para MICA levou tanto à perda como à manutenção de algumas diferenças para IFN- $\gamma$  (% ou MFI), em relação à condição de estímulo com células K562 sem bloqueio. Não houve alteração na ausência de diferenças (% e MFI) entre EDT inicial e avançada, mas foi observada uma menor intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  na EDT avançada (em NK totais e em  $CD56^{dim}$ ) em relação aos CTRs. O bloqueio também levou a uma menor % de células  $CD56^{bright}CD16^-$  produtoras de IFN- $\gamma$  na EDT inicial em relação às CTRs saudáveis, não observada sem bloqueio, bem como à perda da diferença da maior intensidade de expressão em células  $CD56^{bright}$  e  $CD56^{bright}CD16^-$  nos CTRs em relação à EDT inicial. Algumas dessas diferenças ocorreram, principalmente, em relação às células  $CD56^{bright}$ , já descritas como maiores produtoras de citocinas.*

- **IL-10:** assim como ocorreu na condição apenas com estímulo de células K562, na presença de K562 com bloqueio de MICA, **não houve diferença entre EDT inicial e avançada** (% , Figura 46, e MFI, Tabela 20A). Também **não observamos diferença entre EDT avançada e CTRs**, tanto para % (Figura 46) como para MFI (Tabela 20C), em nenhuma subpopulação celular. No entanto, na comparação entre EDT inicial e CTRs, apesar da baixa % de expressão de IL-10 em  $CD56^{dim}$ , nos dois grupos estudados, o bloqueio de MICA mostrou uma **menor %** de expressão de células produtoras de IL-10, **na EDT inicial do que nos CTRs**, para células  $CD56^{dim}$  ( $p= 0,01$ ) (Figura 46). Além disso, com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, **deixou de existir a menor MFI de IL-10 em células  $CD56^{bright}CD16^-$  na EDT inicial**, detectada na condição com o estímulo com K562 sem bloqueio ( $p= 0,043$ , Tabela 19B). No entanto, **a maior intensidade** de expressão de **IL-10 em mulheres em EDT inicial em relação aos CTRs**, previamente observada em  $CD56^{bright}$  após estímulo com células K562 sem bloqueio ( $p=0,0042$ ), **foi mantida** com K562 com bloqueio para MICA ( $p=0,0264$ , teste de Mann-Whitney) (Tabela 20).

*Assim como ocorreu para IFN- $\gamma$ , o estímulo com células bloqueadas para MICA levou tanto à perda como à manutenção de algumas diferenças (% ou MFI), em relação à condição de estímulo com células K562 sem bloqueio na relação com os estádios da doença. Não houve modificação na ausência de diferenças (% e MFI) entre EDT inicial e avançada, ficeo mantidas as maiores % para IL-10 para EDT avançada, apenas na condição sem estímulo. Em relação à condição sem bloqueio, na presença de bloqueio de MICA na superfície celular, houve uma menor % de expressão IL-10, na EDT inicial do que no grupo CTR (em células  $CD56^{dim}$ ), mas deixou de existir a menor MFI de IL-10 em células  $CD56^{bright}CD16^-$  na EDT inicial, na comparação com o grupo CTR.*

Na Tabela 21 (-A, -B, -C) está apresentado um balanço dos principais resultados da expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora e imunorreguladora de células NK e sua relação com estádios da endometriose.



**Figura 46. Comparação da porcentagem (%) de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, na condição após estímulo com células K562 bloqueadas para molécula MICA.** CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; **A)** células NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; **B)** subpopulação CD56<sup>dim</sup>; **C)** subpopulação CD56<sup>bright</sup>; **D)** subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; **E)** subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>; **F)** subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>; estímulo K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; linha pontilhada: indica o valor de zero para % de células, as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão de cada molécula; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 20.** Comparação da intensidade expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 nas subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e controles, **na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.**

A) EDT inicial vs EDT avançada

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)															
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10					
	I/II		III/IV			$p$	I/II		III/IV			$p$	I/II		III/IV	
(n)	med	(n)	med	(n)	med		(n)	med	$p$	(n)	med		(n)	med	$p$	
NK totais	9	83,0	12	44,0	ns	9	0,5	12	-0,6	ns	8	-4,0	9	0,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup>	9	87,0	12	41,0	ns	9	4,4	12	0,2	ns	9	0,7	9	0,0	ns	
CD56 <sup>bright</sup>	5	116,0	11	55,0	ns	5	-1,0	11	-0,3	ns	5	-22,0	8	-11,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	120,0	12	46,0	<b>0,0306</b>	8	1,4	12	-0,1	ns	8	1,5	9	0,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	144,0	12	73,5	ns	8	18,0	12	4,8	ns	8	-4,5	9	-9,0	ns	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA	1	NA	3	NA	NA	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	83,0	10	70,5	ns	6	-5,4	10	2,2	ns	5	-19,0	8	-13,0	ns	

B) EDT inicial vs CTRs

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)															
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10					
	I/II		CTR			$p$	I/II		CTR			$p$	I/II		CTR	
(n)	med	(n)	med	(n)	med		(n)	med	$p$	(n)	med		(n)	med	$p$	
NK totais	9	83	19	87,0	ns	9	0,5	19	18,0	<b>0,0491</b>	8	-4,0	14	19,8	ns	
CD56 <sup>dim</sup>	9	87,0	19	87,0	ns	9	4,4	19	20,1	ns	9	0,7	14	21,2	ns	
CD56 <sup>bright</sup>	5	116,0	17	81,0	ns	5	-1,0	17	8,0	ns	5	-22,0	13	8,0	<b>0,0264</b>	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	120,0	17	94,0	ns	8	1,4	17	20,0	ns	8	1,5	13	0,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	144,0	18	83,0	ns	8	18,0	18	11,0	ns	8	-4,5	14	-2,5	ns	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	1	NA	7	NA	NA	1	NA	7	NA	NA	1	NA	5	NA	NA	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	83,0	15	157,0	ns	6	-5,4	14	9,8	ns	5	-19,0	11	-12,0	ns	

C) EDT avançada vs CTRs

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)															
	CD107a					IFN- $\gamma$					IL-10					
	III/IV		CTR			$p$	III/IV		CTR			$p$	III/IV		CTR	
(n)	med	(n)	med	(n)	med		(n)	med	$p$	(n)	med		(n)	med	$p$	
NK totais	12	44,0	19	87,0	ns	12	-0,55	19	18,0	<b>0,0220</b>	9	0,0	14	19,8	ns	
CD56 <sup>dim</sup>	12	41,0	19	87,0	ns	12	0,20	19	20,1	<b>0,0248</b>	9	0,0	14	21,2	ns	
CD56 <sup>bright</sup>	11	55,0	17	81,0	ns	11	-0,30	17	8,0	<b>0,0060</b>	9	-11,0	13	8,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	12	46,0	17	94,0	ns	12	-0,10	17	20,0	<b>0,0349</b>	9	0,0	13	0,0	ns	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	12	73,5	18	83,0	ns	12	4,75	18	11,0	ns	9	-9,0	14	-2,5	ns	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	7	NA	NA	3	NA	7	NA	NA	1	NA	5	NA	NA	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	70,5	15	157,0	ns	10	2,15	14	9,8	ns	8	-13,0	11	-12,0	ns	

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, descontando--se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de  $p$  significantes na comparação entre os grupos; em vermelho: valor da maior mediana significativa na comparação entre os grupos; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 21. Balanço dos principais resultados da expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e sua relação com estádios da endometriose**

A) Condição basal de cultura, sem estímulo

Condição basal de cultura, sem estímulo					
Análise para frequência de células produtoras			Análise para intensidade de expressão		
CD107a (%)			CD107a (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II > III/IV	0,0368	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II > CTR	0,0238	NK totais
			I/II > CTR	0,0293	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
III/IV < CTR	0,0445	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	III/IV < CTR	0,0185	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>
IFN-γ (%)			IFN-γ (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II < III/IV	0,0470	CD56 <sup>dim</sup>	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II > CTR	0,0056	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	I/II ≈ CTR	ns	todas
III/IV > CTR	0,0061	NK totais	III/IV > CTR	0,0163	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV > CTR	0,0008	CD56 <sup>dim</sup>			
III/IV > CTR	0,0423	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>			
III/IV > CTR	0,0003	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>			
IL-10 (%)			IL-10 (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II < III/IV	0,0145	NK totais	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II < III/IV	0,0220	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>			
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II > CTR	0,0198	NK totais
			I/II > CTR	0,0437	CD56 <sup>dim</sup>
			I/II > CTR	0,0238	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV > CTR	0,0434	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>

CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); ns: valores de p não significantes (p ≥ 0,05); valores de p determinados pelo teste de Mann-Whitney.

### Resumo:

Na **condição basal**, sem estímulo, mulheres em estágio avançado da EDT tiveram menor intensidade de expressão nas células produtoras de CD107a do que mulheres em estádios iniciais, apesar de não terem apresentado diferença na frequência dessas células. Além disso, mulheres em estádios avançados apresentaram menor frequência de células produtoras e menor intensidade de expressão **CD107a**, do que o grupo CTR. Mulheres em estádios iniciais apresentaram maior intensidade de expressão de **CD107a** do que CTRs. A frequência de células produtoras de **IFN-γ** foi maior na doença, tanto em estádio iniciais quanto avançados, em relação aos CTRs. Estádios avançados também tiveram maior frequência células produtoras de **IFN-γ** na comparação com mulheres em estádios iniciais. Quanto à **IL-10**, mulheres em estádios avançados tiveram maior frequência de células produtoras do que as mulheres em estádios iniciais. Para intensidade de expressão de IL-10, tanto estádios iniciais como avançado, apresentaram maior MFI do que mulheres do grupo CTRs.

**Continuação da Tabela 21. Balanço dos principais resultados da expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e sua relação com estádios da endometriose.**

B) Condição de estímulo com células K562

Estímulo com células K562					
Análise para frequência de células produtoras			Análise para intensidade de expressão		
CD107a (%)			CD107a (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II > III/IV	0,0055	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	I/II > III/IV	0,0068	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II ≈ CTR	ns	todas
III/IV < CTR	0,0332	NK totais	III/IV < CTR	0,0043	NK totais
III/IV < CTR	0,0116	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	III/IV < CTR	0,0065	CD56 <sup>dim</sup>
III/IV < CTR	0,0404	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	III/IV < CTR	0,0097	CD56 <sup>bright</sup>
			III/IV < CTR	0,0044	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
IFN-γ (%)			IFN-γ (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II < CTR	0,0308	NK totais
			I/II < CTR	0,0019	CD56 <sup>bright</sup>
			I/II < CTR	0,0184	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV < CTR	0,0203	CD56 <sup>bright</sup>
			III/IV < CTR	0,0420	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
IL-10 (%)			IL-10 (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II < CTR	0,0042	CD56 <sup>bright</sup>
			I/II < CTR	0,0430	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV ≈ CTR	ns	todas

CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); ns: valores de *p* não significantes ( $p \geq 0,05$ ); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

### Resumo:

**Na condição com estímulo de células K562**, observamos que mulheres em estádios avançados da EDT tiveram menor frequência de células com produção de **CD107a** e menor intensidade de expressão nas células produtoras, em relação às mulheres em estádios iniciais. Essa menor frequência e intensidade de expressão de CD107a em mulheres em estádios avançados, foi observada em relação a mulheres do grupo CTR. Para **IFN-γ**, a frequência de células produtoras e a intensidade de expressão foram semelhantes entres os estádios, mas houve menor intensidade de expressão na EDT, em ambos os estádios, do que mulheres CTRs. Também para **IL-10**, tanto mulheres em estádios iniciais como avançados, apresentaram menor intensidade de expressão do que CTRs, mas sem diferença para frequência de células produtoras e intensidade de expressão de IL-10 entre os diferentes estádios.

**Continuação da Tabela 21. Balanço dos principais resultados da expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK e sua relação com estádios da endometriose.**

C) Condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA

Estímulo com células K562BLOQ					
Análise para frequência de células produtoras CD107a (%)			Análise para intensidade de expressão CD107a (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II > III/IV	0,0306	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
I/II ≈ CTR	ns	todas	I/II ≈ CTR	ns	todas
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV ≈ CTR	ns	todas
IFN-γ (%)			IFN-γ (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II < CTR	0,0326	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	I/II < CTR	0,0491	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV < CTR	0,022	NK totais
			III/IV < CTR	0,0248	CD56 <sup>dim</sup>
			III/IV < CTR	0,0060	CD56 <sup>bright</sup>
			III/IV < CTR	0,0349	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>
IL-10 (%)			IL-10 (MFI)		
grupos	p	Subpopulações	grupos	p	Subpopulações
I/II ≈ III/IV	ns	todas	I/II ≈ III/IV	ns	todas
I/II < CTR	0,01	CD56 <sup>dim</sup>	I/II < CTR	0,0264	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>
III/IV ≈ CTR	ns	todas	III/IV ≈ CTR	ns	todas

CTR: grupo controle; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); ns: valores de p não significantes (p ≥ 0,05); valores de p determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

### Resumo:

**Com estímulo de células K562 bloqueadas para MICA, as diferenças observadas sem bloqueio para frequência de células produtoras de CD107a foram perdidas, mantendo-se semelhantes entre estádios e entre estádios e CTRs. Foi mantida apenas a maior intensidade de expressão em mulheres em estádios iniciais em relação aos avançados.**

O bloqueio não alterou a maior intensidade de expressão de **IFN-γ** para estádios iniciais e avançados, na comparação com mulheres do grupo CTR. No entanto, o bloqueio resultou numa menor frequência de células produtoras dessa citocina, em mulheres em estádios iniciais comparadas aos CTRs. Para **IL-10**, o bloqueio de MICA resultou em menor frequência de células produtoras e menor intensidade de expressão dessa citocina na EDT inicial em relação aos CTRs, mas foi mantida a semelhança (% e MFI) entre os estádios.

#### 4.4.5 Expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ e IL-10 e relação com às fases do ciclo menstrual

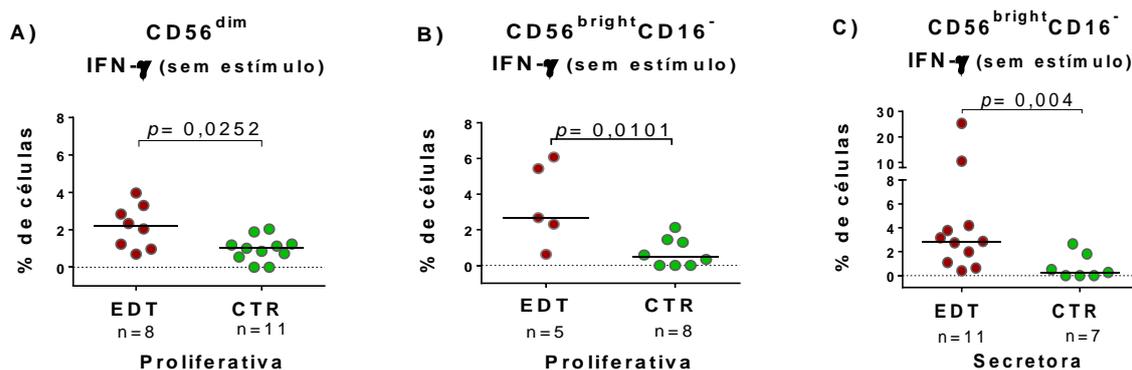
A frequência (%) de células produtoras de CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e a intensidade de expressão (MFI) dessas moléculas em células NK e subpopulações, foram analisadas de acordo com as fases do ciclo menstrual: proliferativa/estrogênica (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo) e secretora/progestacional (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo). Os dados obtidos em relação às fases do ciclo em mulheres com EDT foram comparados aos de mulheres CTRs saudáveis. As análises foram realizadas para as três condições de estudo: basal de cultura (sem estímulo), com estímulo com células K562, e após estímulo com células K562 bloqueadas para MICA, em células NK totais e nas subpopulações de NK. A subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> de mulheres com EDT não foi analisada, pois poucas amostras atingiram o valor de corte ( $\geq 100$  eventos na aquisição do citômetro).

##### 4.4.5.1 Expressão das moléculas e fases do ciclo: condição basal de cultura

A % de células com expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, e a intensidade de expressão dessas moléculas, não apresentaram diferenças entre as fases proliferativa e secretora, tanto no grupo de mulheres com EDT como no grupo CTR, nas diferentes subpopulações de células NK ( $p=ns$ ) (Anexo X, Tabela 7). Todas as comparações de variáveis contínuas foram feitas pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

Na comparação das fases entre os grupos EDT e CTR, não observamos diferenças para CD107a e IL-10 (% e MFI) nas diferentes subpopulações celulares ( $p= ns$ , teste de Mann-Whitney) (Anexo X, Tabela 8). No entanto, para IFN- $\gamma$ , observamos que mulheres com EDT apresentaram maiores % de células CD56<sup>dim</sup> produtoras dessa citocina na fase proliferativa do ciclo ( $p= 0,0252$ ), do que mulheres do grupo CTR (Figura 47)

Observamos que células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> também apresentaram maiores % de expressão de IFN- $\gamma$  na EDT, em relação ao grupo CTR, mas isto ocorreu independentemente da fase do ciclo, uma vez que essa maior frequência ocorreu tanto na fase proliferativa ( $p= 0,0101$ ) como na secretora do ciclo ( $p= 0,0041$ ) (Figura 47).



**Figura 47.** Frequência de expressão (%) de IFN- $\gamma$  em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição basal de cultura, sem estímulo. **A e B)** fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); **C)** fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; linha pontilhada: indica o valor de zero de % de células; as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão de IFN- $\gamma$  em cada grupo de estudo, para a subpopulação celular específica; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.4.5.2 Expressão das moléculas e fases do ciclo: estímulo com células K562

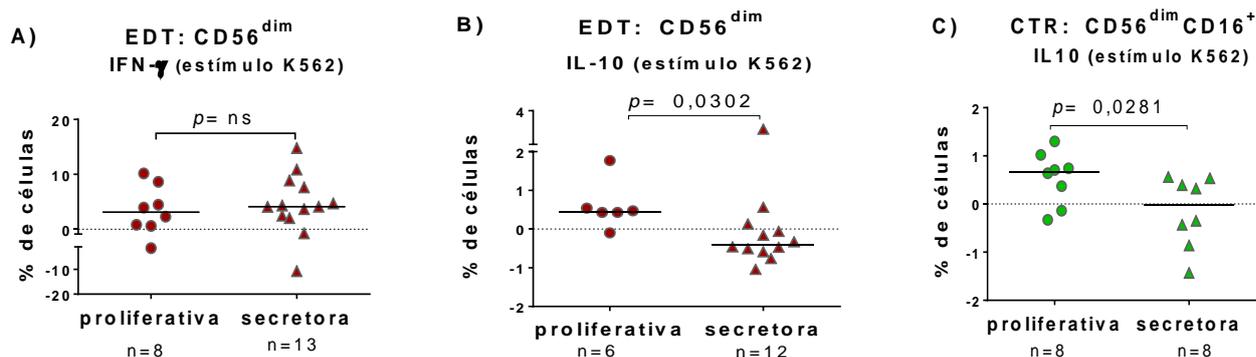
Todas as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste estatístico de *Mann-Whitney* (Figura 48 e Anexo X, Tabela 9).

##### ► Grupo CTR:

- **CD107a:** não foi observada diferença, tanto para % de células como para intensidade de expressão, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo.
- **IFN- $\gamma$ :** não foi observada diferença, tanto para % de células como para intensidade de expressão, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo.
- **IL-10:** % de células CD56<sup>dim</sup>CD16: **proliferativa > secretora** ( $p= 0,0281$ ). Não houve diferença para a intensidade de expressão.

##### ► Grupo EDT:

- **CD107a:** não foi observada diferença, tanto para % de células como para intensidade de expressão, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo.
- **-IFN- $\gamma$ :** não foi observada diferença, tanto para % de células como para intensidade de expressão, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo.
- **IL-10:** % de células CD56<sup>dim</sup>: **proliferativa > secretora** ( $p= 0,0302$ ) Não houve diferença para a intensidade de expressão (semelhante ao observado no grupo CTR).

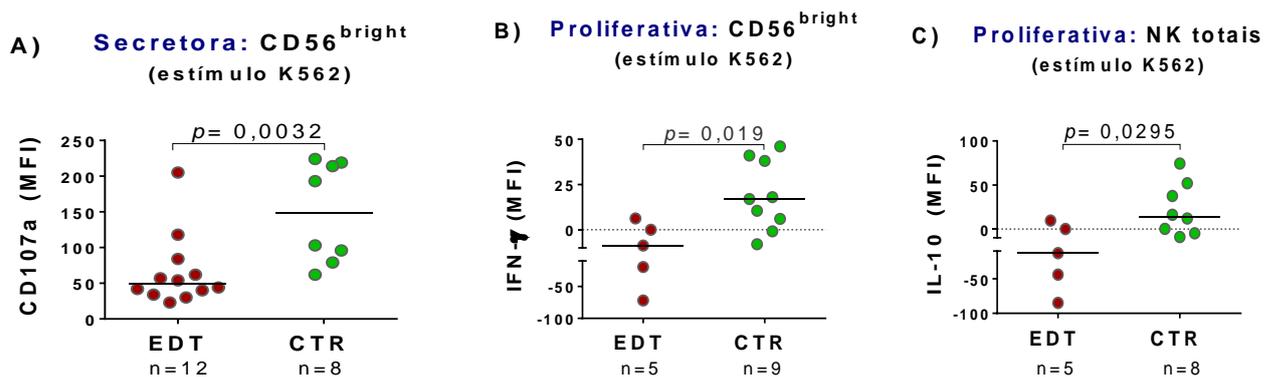


**Figura 48. Frequência da porcentagem (%) de expressão das moléculas IFN- $\gamma$  e IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, de mulheres com endometriose e de controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562.** EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com células K562: valores do estímulo descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; n: número de amostras avaliadas em cada fase do grupo; linha pontilhada: indica o valor de zero para % de células; as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão nas diferentes fases do ciclo menstrual; ns: valor de  $p$  não significante ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### ► Grupo EDT vs grupo CTR:

Na análise da % de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 entre grupos, na condição com estímulo de K562, não foram observadas diferenças significativas, nas diferentes fases do ciclo menstrual (Anexo X, Tabela 10). No entanto, para MFI, foram observadas diferenças para as três moléculas (Figura 49) (os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney*).

- **CD107a: EDT < CTRs**, na fase **secretora**, nas subpopulações CD56<sup>bright</sup> ( $p=0,0032$ ) e em CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p=0,0259$ )
- **IFN- $\gamma$ : EDT < CTRs**, na fase **proliferativa**, nas subpopulações CD56<sup>bright</sup> ( $p=0,019$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p=0,0186$ )
- **IL-10: EDT < CTRs**, na fase **proliferativa**, em células NK totais ( $p=0,0295$ )



**Figura 49. Comparação da intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas diferentes fases do ciclo menstrual, na condição com estímulo com células K562.** EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com células K562: valores do estímulo descontando-se o valor basal(sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI; mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de amostras avaliadas em cada grupo; as barras horizontais representam as medianas de MFI de expressão nas diferentes fases do ciclo menstrual; linha pontilhada: indica o valor de zero de MFI; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

#### 4.4.5.3 Expressão das moléculas e fase do ciclo: estímulo com células K562 bloqueadas para MICA

Na presença de bloqueio para a molécula MICA na superfície celular das células K562, observamos poucas mudanças em relação à condição com estímulo apenas com K562, sem bloqueio. (Figura 50 e Anexo X, Tabela 11).

Nas análises da % de células com expressão e intensidade da expressão (MFI), entre as fases do ciclo, em cada grupo (EDT e CTR) separadamente, e entre os grupos, observamos:

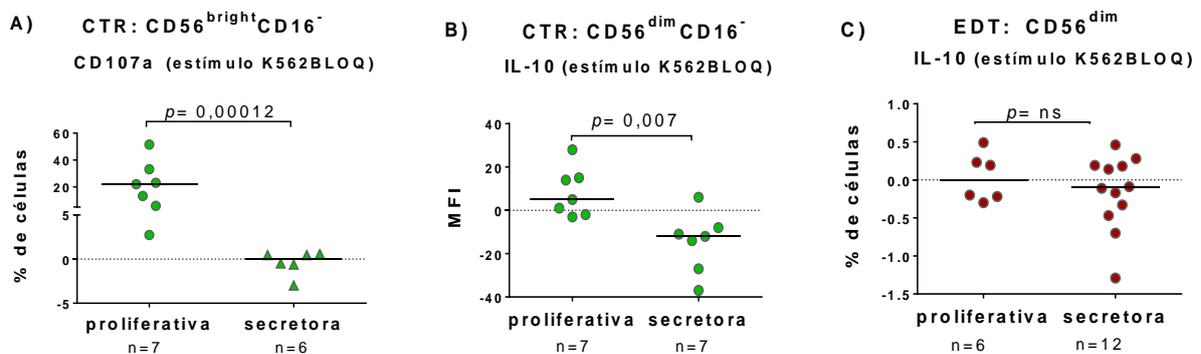
##### ► **Grupo CTR:**

- **CD107a:** maior % de células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> produtoras de CD107a na **fase proliferativa** do ciclo ( $p= 0,0012$ ). Essa diferença não foi encontrada na condição com estímulo com células K562 sem bloqueio. Não foi observada diferença para MFI.
- **IFN- $\gamma$ :** assim como ocorreu na presença de estímulo com K562, não houve diferença na % de células que expressaram essa citocina, nem na intensidade de expressão (MFI).
- **IL-10:** detectamos **maior MFI** em células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,007$ ) na **fase proliferativa** do ciclo (mesma diferença já observada na ausência de bloqueio, para % de expressão).

► **Grupo EDT:**

- **CD107a:** não foi encontrada diferença (% e MFI) para a expressão de CD107a entre as fases do ciclo
- **IFN- $\gamma$ :** assim como ocorreu na presença de estímulo com K562, não houve diferença na % de células nem na intensidade de expressão (MFI).
- **IL-10:** não foi encontrada diferença (% e MFI) para a expressão de IL-10 entre as fases do ciclo. Na condição de estímulo sem bloqueio, observamos maior % de IL-10 em CD56<sup>dim</sup>, na fase proliferativa.

A maior % de células CD56<sup>dim</sup> produtoras de IL-10 na fase proliferativa, na condição de estímulo apenas com K562 ( $p=0,0302$ , Figura 48), deixou de existir como estímulo com K562 bloqueadas para MICA de superfície ( $p=0,4936$ ) (Figura 50).



**Figura 50. Porcentagem (%) de células com expressão de CD107a e IL-10 e intensidade de expressão de IL-10, em subpopulações de células NK circulantes, em mulheres com endometriose e em controles, em diferentes fases do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA. A e B) grupo controle (CTR), C) grupo endometriose (EDT); fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com células K562BLOQ: K562 bloqueada para a proteína MICA - valores descontando-se o valor basal(sem estímulo);valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI; mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de amostras avaliadas em cada fase do ciclo; as barras horizontais representam as medianas da porcentagem de expressão ou de MFI, nas diferentes fases do ciclo menstrual; linha pontilhada: indica o valor de zero para % ou MFI; ns; valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ), valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

► **Grupo EDT vs grupo CTR:**

Na análise comparativa entre os grupos, na condição de bloqueio para MICA, observamos diferenças para as três moléculas envolvidas na atividade efetora e imunorreguladora de células NK (Figura 51 e Anexo X, Tabela 12). Para todas as análises utilizamos o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

- **CD107a:** foi mantida a mesma diferença de menor intensidade de expressão de CD107a na EDT em comparação com o grupo CTR, na fase secretora,

na subpopulação CD56<sup>bright</sup> ( $p= 0,0336$ ), previamente observada na condição sem bloqueio ( $p= 0,0032$ , Figura 49).

**Foi perdida a diferença** encontrada na condição sem bloqueio, de **menor** intensidade de expressão de CD107a, **na EDT, na fase secretora** do ciclo, na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0, 0754$ ).

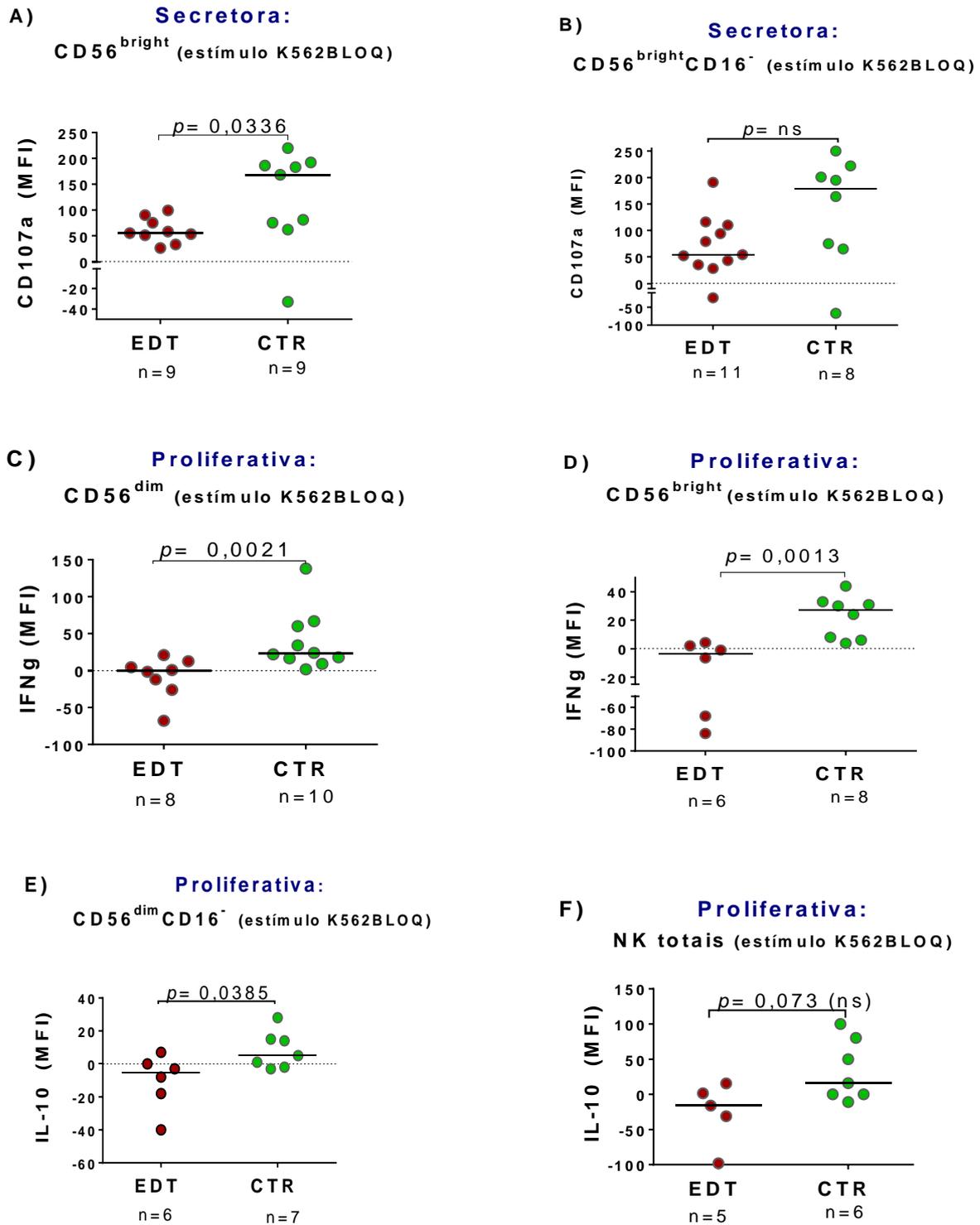
- **IFN- $\gamma$** : as diferenças ocorreram apenas para MFI, assim como observamos para a condição sem bloqueio. Observamos **menor intensidade** de expressão **na EDT** do que no grupo CTR, **na fase proliferativa** do ciclo em células: NK totais ( $p= 0,001$ ), CD56<sup>dim</sup> ( $p= 0,0021$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0033$ ), CD56<sup>bright</sup> ( $p= 0,0013$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0051$ ).

As diferenças observadas de expressão de **IFN- $\gamma$**  para as subpopulações CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, previamente descritas com o estímulo com K562 sem bloqueio (Anexo X, Tabela 10), não foram alteradas na condição de estímulo com bloqueio para MICA.

- **IL-10: menor intensidade** de expressão em CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p= 0,0385$ ), **na EDT, na fase proliferativa**.

Ressaltamos que a diferença, previamente observada de menor intensidade de expressão para IL-10 na EDT, com estímulo sem bloqueio (em NK totais,  $p= 0,0295$ ), deixou de existir na presença de estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA ( $p= 0,0730$ , teste de *Mann-Whitney*) (Anexo X, Tabela 12).

**O balanço** das principais **diferenças das frequências de células** com expressão das moléculas **CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10**, e suas **intensidades** de expressão, **entre os grupos EDT e CTR**, e relação com as **fases do ciclo menstrual**, está apresentado na **Tabela 22**.



**Figura 51.** Intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 em subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, em diferentes fases do ciclo menstrual, na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA. EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA – valores descontando-se o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI; mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de amostras avaliadas em cada grupo; as barras horizontais representam as medianas de MFI nos diferentes grupos; linha pontilhada: indica o valor de zero para MFI; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 22. Balanço** das principais diferenças das **frequências de células** com expressão das moléculas **CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10**, e suas **intensidades de expressão**, entre os grupos endometriose e controles, e relação com a **fase do ciclo menstrual**.

Condição basal de cultura, sem estímulo					
%			MFI		
	Prolif.	Secret.		Prolif.	Secret.
<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>			<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR
CD56 <sup>dim</sup>	<b>EDT &gt; CTR</b>				
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	<b>EDT &gt; CTR</b>	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &gt; CTR</b>			
<b>IL-10</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>IL-10</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR
Estímulo com K562					
%			MFI		
	Prolif.	Secret.		Prolif.	Secret.
<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	CD56 <sup>bright</sup> <b>EDT &lt; CTR</b> CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &lt; CTR</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	CD56 <sup>bright</sup> <b>EDT &lt; CTR</b> CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &lt; CTR</b>	EDT $\approx$ CTR
<b>IL-10</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>IL-10</b>	NK totais <b>EDT &lt; CTR</b>	EDT $\approx$ CTR
Estímulo com K562BLOQ					
%			MFI		
	Prolif.	Secret.		Prolif.	Secret.
<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>CD107a</b>	EDT $\approx$ CTR	CD56 <sup>bright</sup> <b>EDT &lt; CTR</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	CD56 <sup>dim</sup> <b>EDT &lt; CTR</b> CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &lt; CTR</b> CD56 <sup>bright</sup> <b>EDT &lt; CTR</b> CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &lt; CTR</b>	EDT $\approx$ CTR
<b>IL-10</b>	EDT $\approx$ CTR	EDT $\approx$ CTR	<b>IL-10</b>	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup> <b>EDT &lt; CTR</b>	EDT $\approx$ CTR

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Prolif: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secret: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; em vermelho: valores do grupo considerados maiores, na comparação entre os grupos analisados; em azul: valores do grupo considerados menores, na comparação entre os grupos analisados;  $\approx$ : resultados semelhantes.

### Resumo:

*Na condição basal de cultura, sem estímulo, mulheres com EDT apresentaram maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  na fase proliferativa/estrogênica. No entanto, na presença de estímulo, com e sem bloqueio de MICA, a frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  tornaram-se semelhantes aos controles saudáveis. Porém, na presença de estímulo com células K562, a intensidade de expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 passaram a ser menores na EDT do que em controles. Essa diferença foi observada em um maior número de subpopulações NK, principalmente para IFN- $\gamma$ , quando na presença de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.*

#### 4.4.6 Citotoxicidade pelas células NK

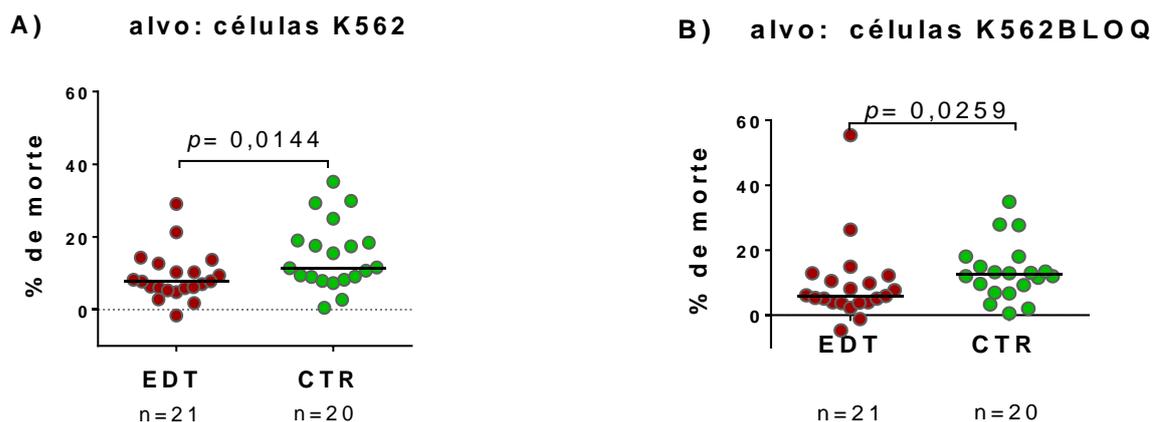
A capacidade citotóxica (CTX) de células NK circulantes, no grupo de mulheres com EDT (n=21) e em mulheres controles saudáveis (n=20), foi avaliada pela % de morte de células K562 e de células K562 bloqueadas para a molécula MICA, representando a presença de MICA solúvel.

A % de células K562 e de K562 bloqueadas para MICA com expressão de MICA foi analisada em cada data do ensaio CTX, uma vez que nem todas as PBMCs foram testadas para a sua capacidade citotóxica no mesmo dia. A mediana da frequência de células K562 marcadas com o corante fluorescente CFSE (K562\*CFSE) e positivas para a expressão de MICA foi de 51,5% e, em células K562\*CFSE e bloqueadas para MICA (K562\*CFSEBLOQ) foi de 28,8%, correspondendo a uma mediana de bloqueio de MICA de 39,8% (Anexo XI, Tabela 15). Apesar de ainda considerado como baixo bloqueio, seu o impacto para a intensidade de expressão (MFI) foi considerado equivalente ao da frequência de expressão de MICA, 32,6%, considerando-se a mediana de intensidade de expressão (MFI) pré-bloqueio de 1914 e, pós-bloqueio, de 1114 (Anexo X, Tabela 13).

##### 4.4.6.1 Citotoxicidade contra células K562 sem bloqueio e com bloqueio para MICA.

A análise comparativa da **CTX entre os grupos (EDT e CTR)** foi analisada nas condições de **CTX contra as células K562 sem e com bloqueio para MICA** (teste de *Mann-Whitney*) (Figura 52).

- **CTX contra K562 sem bloqueio:**
  - ▶ Grupo EDT vs grupo CTR:  
**CTX EDT < CTX CTRs** (medianas: 7,7% vs 11,5%,  $p= 0,0144$ )
- **CTX contra K562 bloqueadas para MICA:**
  - ▶ Grupo EDT vs grupo CTR:  
**CTX EDT < CTX CTR** (medianas 5,9% vs 12,45%,  $p= 0,0259$ )



**Figura 52. Comparações da citotoxicidade (CTX) pelas células NK circulantes entre mulheres com endometriose e controles. A) CTX contra células K562; B) CTX contra células K562 bloqueadas para a proteína MICA (K562BLOQ); valores de CTX contra K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; as barras horizontais representam as medianas nos diferentes grupos; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

Cada grupo de estudo, CTR e EDT, foi também analisado de forma pareada, para as condições de **CTX contra células K562 sem e com o bloqueio da proteína MICA** na superfície celular (teste de *Wilcoxon*) (Figura 53).

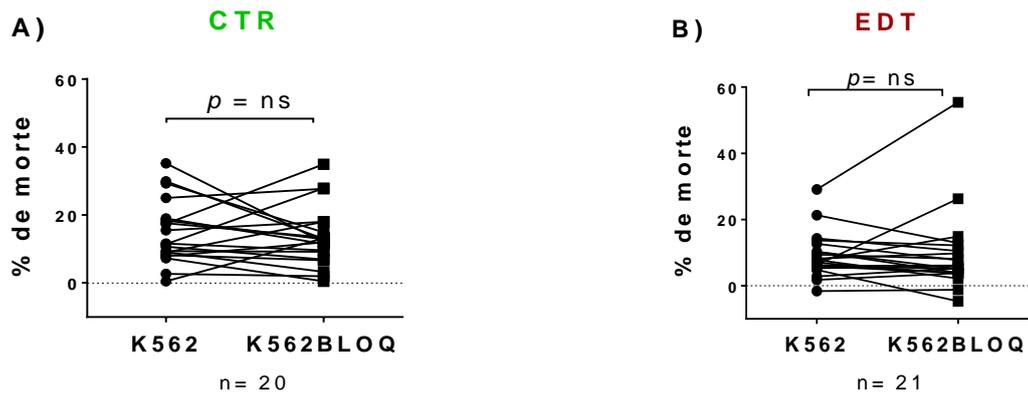
- ▶ **Grupo CTR: não houve diferença na CTX contra células K562, sem e com o bloqueio de MICA**

No grupo CTR, a mediana de % de CTX contra células K562 foi de 11,5 % (0,5%- 35,2%) e contra células K562BLOQ foi de 12,5% (0,5%- 34,9%) ( $p= 0,4524$ )

- ▶ **Grupo EDT: não houve diferença na CTX contra células K562, sem e com o bloqueio de MICA**

No grupo EDT, a mediana de frequência de CTX contra K562 foi 7,7% (-1,6%- 29,1%) e contra células K562BLOQ foi de 5,9% (-4,7%- 55,4%) ( $p= 0,3784$ )

Ressaltamos que, de forma geral, com o bloqueio da molécula MICA tivemos modificação em relação à condição sem bloqueio. Os resultados da CTX de células K562 e de K562BLOQ, frente a cada amostra estudada, e a % de bloqueio de MICA correspondente, para cada experimento, estão apresentados no Anexo X, Tabela 14.

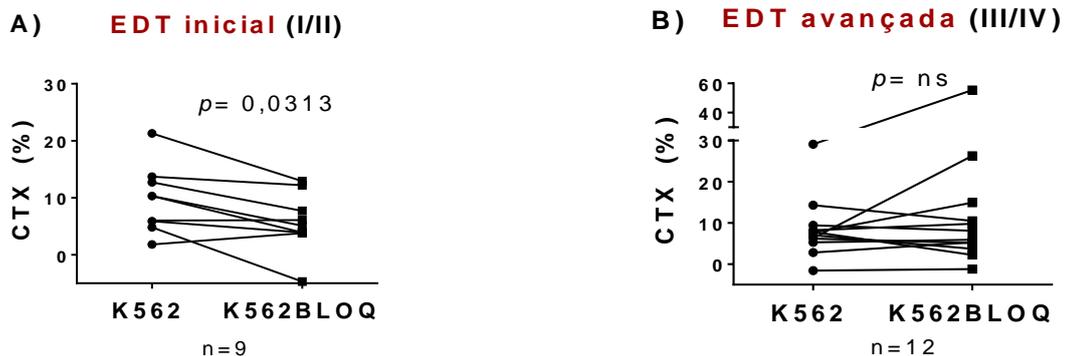


**Figura 53. Citotoxicidade pelas células NK circulantes de mulheres com endometriose e de controles, contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA. A) CTR: grupo controle; B) EDT: grupo endometriose; K562BLOQ células K562 bloqueadas para MICA; valores de CTX contra K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); linha pontilhada: valor zero de % de morte; valor de  $p$  determinado pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.**

#### 4.4.6.2 Citotoxicidade e relação com os estádios da endometriose

##### i) Análise da CTX contra células alvo K562, antes e após o bloqueio para MICA

O bloqueio levou a uma **diminuição significativa** da porcentagem de **CTX** nos **estádios iniciais da doença** (med 5,1%, -4,7-12,9, min-max), em relação à CTX contra K562 sem bloqueio (med 10,3%, 1,8- 21,3, min-max) ( $p= 0,0313$ , teste de *Wilcoxon*). No entanto, o bloqueio de MICA não induziu diferença na CTX dos estádios avançados da doença (K562: med 7,4%, -1,6-29,1, min-max; K562BLOQ: med 7%, -1,2-55,4, min-max;  $p= 0,4322$ , teste de *Wilcoxon*) (Figura 54).



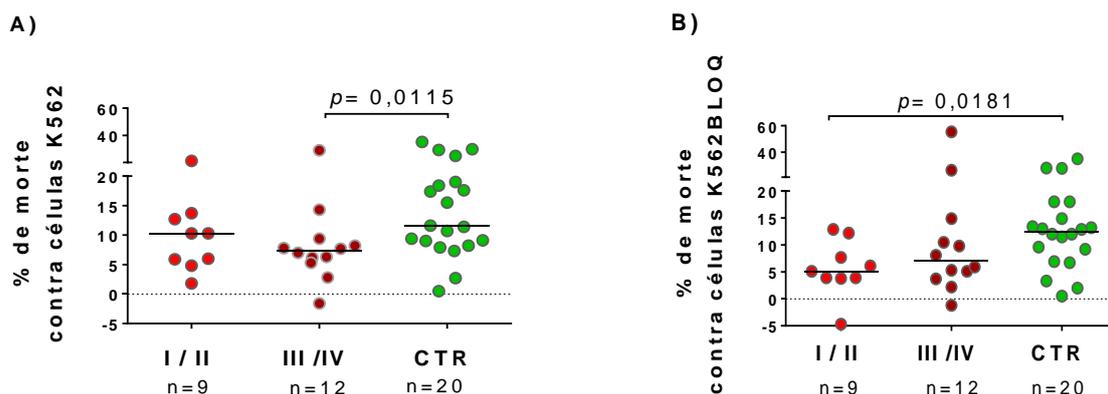
**Figura 54. Citotoxicidade pelas células NK circulantes frente a células K562 e células K562 bloqueadas para MICA, nos diferentes estádios da endometriose. EDT: grupo endometriose; K562BLOQ: células bloqueadas para a proteína MICA; I/II, estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; A) mulheres com EDT em estádios iniciais; B) mulheres com EDT em estádios avançado; valores de % de morte de K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo, linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); citotoxicidade avaliada por porcentagem (%) de morte de células K562; valores de  $p$  determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.**

ii) **Análise da CTX contra células alvo K562 entre mulheres em estádios iniciais e avançados da EDT, e o grupo CTR.**

A CTX contra células K562 não mostrou diferença na comparação entre estádios iniciais (10,3%, 1,8 - 21,30) e avançados da doença (7,35%, -1,6 - 29,1) ( $p= 0,6885$ , teste de *Mann-Whitney*). O mesmo foi observado entre mulheres em estádios iniciais em comparação com CTRs saudáveis (11,5%, 0,5–35,2) ( $p= 0,1792$ , teste de *Mann-Whitney*). No entanto, observamos que mulheres com **EDT avançada** apresentaram **menor CTX** (7,35%, -1,6 - 29,1) em **relação ao grupo CTR saudável** (11,5%, 0,5–35,2) ( $p= 0,0115$ , teste de *Mann-Whitney*) (Figura 55).

iii) **Análise da CTX contra células alvo K562 bloqueadas para MICA, entre mulheres em estádios iniciais e avançados da EDT, e o grupo CTR**

A CTX contra células K562BLOQ também não mostrou diferença na comparação entre estádios iniciais (med 5,1%, -4,7-12,9, min-max) e avançados da EDT (med 7,0%, -1,2-55,4, min-max) ( $p= 0,4322$ , teste de *Mann-Whitney*). Mulheres com EDT avançada (med 7,0%, -1,2-55,4, min-max) também não apresentaram diferença em relação à CTX de CTRs saudáveis (med 12,5%, 0,5-34,9, min-max) na comparação com bloqueio ( $p= 0,1725$ , teste de *Mann-Whitney*). Diferentemente da CTX contra células K562 sem bloqueio, **a CTX contra células K562BLOQ foi menor na EDT inicial** (med 5,1%, -4,7-12,9, min-max), em relação aos CTRs saudáveis (med 12,5%,0,5-34,9, min-max) ( $p= 0,0181$ , teste de *Mann-Whitney*) (Figura 55).



**Figura 55. Citotoxicidade pelas células NK circulantes de mulheres em estádios iniciais e avançados da endometriose e de controles. A) CTX contra células K562; B) CTX contra células K562 bloqueadas para MICA; CTX: citotoxicidade; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com rASRM; CTR: grupo controle; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; valores de CTX contra células K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; citotoxicidade avaliada por porcentagem (%) de morte de células K562; as barras horizontais representam as medianas nos diferentes grupos; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

#### 4.4.6.3 Citotoxicidade e análise de correlação com níveis de MICA solúvel

A CTX (% de morte) induzida pelas células NK circulantes contra células K562, e células K562 com bloqueio para MICA, foi avaliada em relação à variação dos níveis de MICA solúvel (sMICA) (sistêmico, soro, e no microambiente da lesão, fluido peritoneal - FP).

Não observamos correlação entre a % de morte de células K562 e níveis de sMICA, tanto no soro como no FP, em nenhum grupo de estudo (CTR: soro,  $r=0,02$ ,  $p= 0,9511$  e FP,  $r= -0,2$ ,  $p= 0,3609$ ; EDT: soro,  $r= 0,04$ ,  $p= 0,8769$  e FP,  $r= 0,2$ ,  $p= 0,4806$ ) (teste de correlação de *Spearman*) (Anexo X, Figura 1).

De forma semelhante ao encontrado para a condição contra K562 sem bloqueio, a CTX contra células K562 bloqueadas para a proteína MICA também não mostrou correlação com níveis de sMICA no soro e no FP, em ambos os grupos (CTR: soro,  $r=0,03$ ,  $p= 0,8833$  e FP,  $r= -0,02$ ,  $p= 0,9170$ ; EDT: soro,  $r=0,1$ ,  $p= 0,6807$  e FP,  $r= -0,5$ ,  $p= 0,0538$ ) (teste de correlação de *Spearman*) (Anexo X, Figura 2).

Uma vez que os níveis de sMICA foram, neste estudo, descritos como maiores na EDT avançada (Resultados, item 4.3), avaliamos também se houve correlação entre a citotoxicidade contra as células K562, e contra células K562 bloqueadas para MICA, e os níveis de sMICA (soro e FP) em mulheres com EDT, estratificadas para os estádios da doença. Não foram observadas diferenças significativas para a correlação entre a CTX e sMICA (soro e FP), tanto nos estádios iniciais como avançados da doença ( $p= ns$ , teste de correlação de *Spearman*) (Anexo XI, Tabela 15).

#### 4.4.6.4 Citotoxicidade e relação com as fases do ciclo menstrual

##### i) Nos grupos EDT e CTR, frente a células K562 com e sem bloqueio de MICA

Tanto na fase proliferativa como na fase secretora, ambos os grupos não apresentaram diferença na CTX (% de morte), antes (K562) e após o bloqueio de MICA(K562BLOQ). Os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Wilcoxon* (Figura 56).

- **Fase proliferativa:**

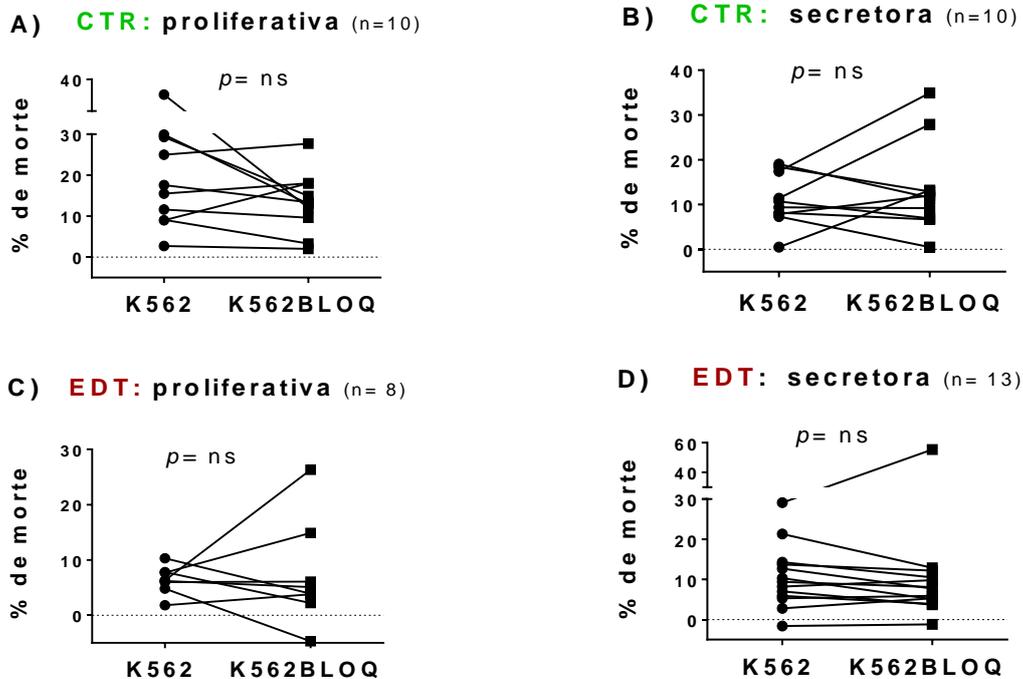
- ▶ Grupo CTR: a mediana de % de morte contra células K562 foi de 16,6% (2,7-35,2, min-max) e, contra células K562BLOQ foi de 13,2% (2,0-27,7, min-max) ( $p= 0,1934$ )

- ▶ Grupo EDT: a mediana de CTX contra K562 foi 6,3% (1,8-10,3, min-max) e, contra células K562BLOQ foi de 4,5% (-4,7-26,3, min-max) ( $p> 0,9999$ )

- **Fase secretora:**

- ▶ **Grupo CTR:** a mediana de % de morte de K562 foi de 10,1% (0,5-19,0, min-max) e, conta células K562BLOQ, foi de 11,75% (0,5-34,9, min-max) ( $p= 0,6175$ )

- ▶ **Grupo EDT:** a mediana de CTX contra K562 foi de 9,4% (-1,6-9,4, min-max) e, contra células K562BLOQ foi de 7,8% (-1,2-55,4, min-max) ( $p= 0,2036$ )



**Figura 56. Porcentagem (%) de morte de células K562 e células K562 após o bloqueio da proteína MICA, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, em mulheres com endometriose e controles.** CTR: grupo controle; EDT: grupo endometriose; K562BLOQ: células K562 boqueadas para MICA; valores de CTX contra células K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; citotoxicidade avaliada por porcentagem (%) de morte de células K562; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste pareado, não paramétrico, de *Wilcoxon*.

ii) **Entre grupos, EDT e CTRs, frente a células K562 com e sem bloqueio de MICA**

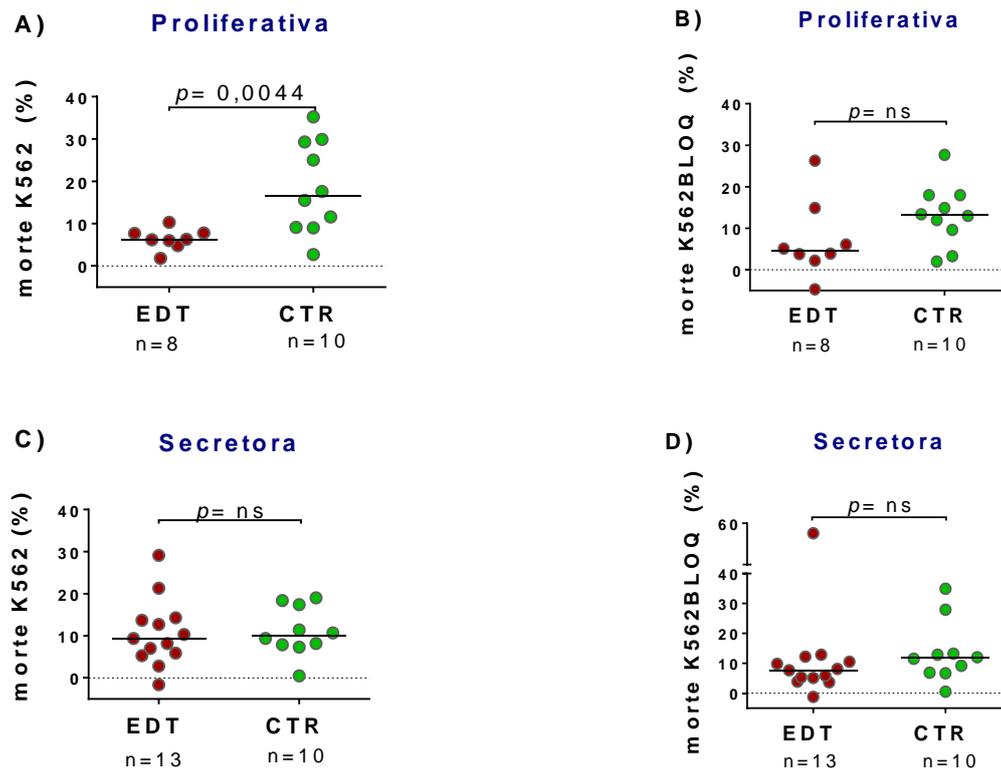
Os valores de  $p$  das análises comparativas entre os grupos foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

- **Fase proliferativa:**

Mulheres com EDT apresentaram menor % de morte (CTX) contra células K562 (que expressam MICA) (6,3%, 1,8 -10,3) em relação às mulheres CTRs (16,6%, 2,7-35,2, min-max) ( $p= 0,0044$ ) (Figura 57). No entanto, para CTX contra células K562BLOQ não houve diferença entre o grupo EDT (4,5%, -4,7-26,3, min-max) e o grupo CTR (13,2%, 2,0-27,7, min-max) ( $p= 0,1799$ ).

- **Fase secretora:**

**Não houve diferença entre os grupos** estudados. Mulheres com EDT apresentaram mediana de % de morte, CTX, contra células K562 de 9,4% (-1,6-29,1, min-max), semelhante à de mulheres CTRs, 10,1% (0,5-19,0, min-max) ( $p= 0,6814$ ). Para a CTX contra células K562BLOQ, o grupo EDT apresentou mediana de 7,7% (-1,2-55,4, min-max) e, no grupo CTR, de 11,75% (0,5-34,9, min-max) ( $p= 0,2139$ ) (Figura 57).

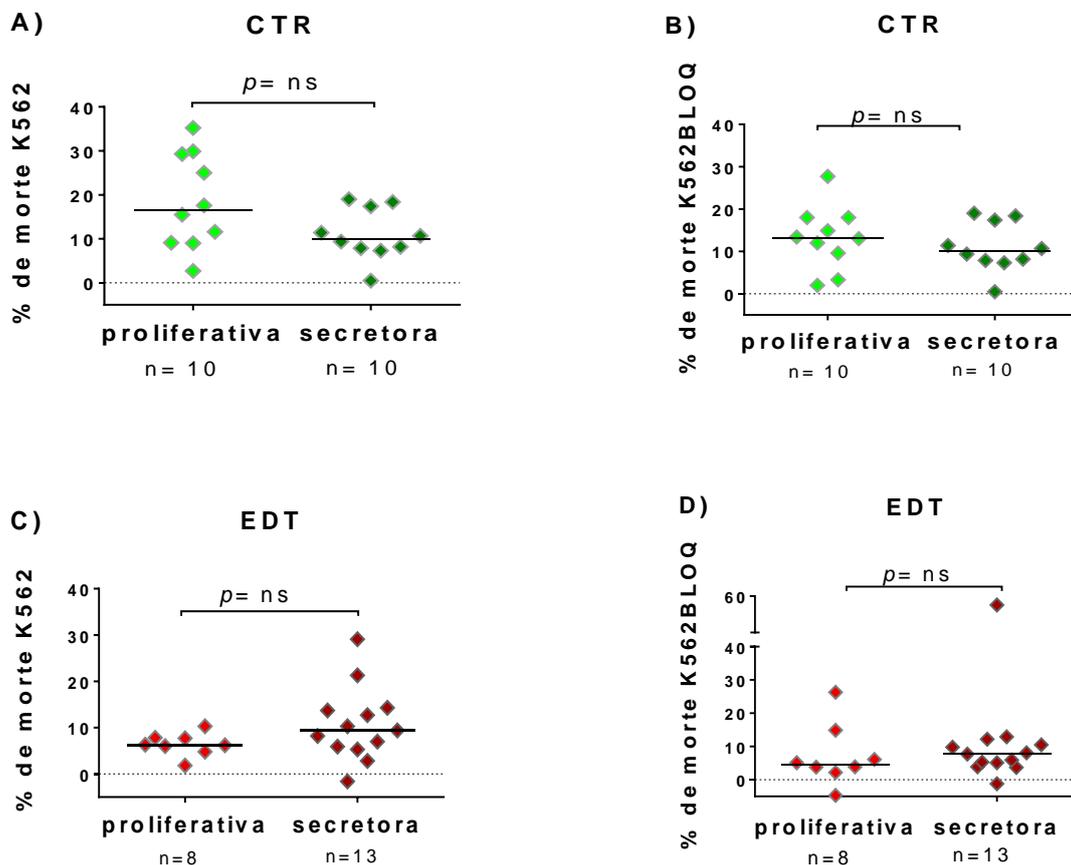


**Figura 57. Comparações da frequência de morte de células K562 com e sem bloqueio da proteína MICA, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, entre os grupos de mulheres com endometriose e controles. A e C) citotoxicidade frente a células K562; B e D) citotoxicidade frente a células K562 bloqueadas para MICA; CTR: grupo controle; EDT: grupo endometriose; CTX: citotoxicidade; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; valores de CTX contra células K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); as barras horizontais representam as medianas nos diferentes grupos; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.**

### iii) Citotoxicidade entre as fases do ciclo menstrual, na EDT e CTRs, frente às células K562 com e sem bloqueio de MICA

A comparação da CTX entre as diferentes fases do ciclo, tanto o grupo EDT como o grupo CTR, não mostrou diferença frente a células K562 e frente a células K562 bloqueadas para MICA. Os valores de  $p$  foram determinados pelo teste de *Mann-Whitney* (Figura 58).

- **CTX contra células K562:**
  - ▶ Grupo CTR: a mediana de % de morte na fase proliferativa foi de 16,6% (2,7-35,2, min-max) e, na fase secretora, de 10,1% (0,5-19,0, min-max) ( $p=0,1230$ )
  - ▶ Grupo EDT: a mediana da % de morte na fase proliferativa foi de 6,3%, (1,8-10,3, min-max) e, na fase secretora, de 9,4% (-1,6-29,1, min-max) ( $p=0,1688$ )
- **CTX contra células K562BLOQ:**
  - ▶ Grupo CTR: mediana de % de morte na fase proliferativa foi de 13,2 % (2,0-27,7, min-max) e, na fase secretora, de 10,5% (0,5-19,0, min-max) ( $p=0,4224$ )
  - ▶ Grupo EDT: a mediana de % morte na fase proliferativa foi de 4,5 % (-4,7-26,3, min-max) e, na fase secretora, de 7,7% (-1,2-55,4, min-max) ( $p=0,3638$ )



**Figura 58. Comparações da frequência de morte de células K562, e de células K562BLOQ, entre as diferentes fases do ciclo, no grupo de mulheres com endometriose e controles. A e C) citotoxicidade frente a células K562; B e D) citotoxicidade frente a células K562 bloqueadas para MICA; CTR: grupo controle; EDT: grupo endometriose; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; valores de CTX contra células K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada: valor zero de % de células mortas; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); as barras horizontais representam as medianas nos diferentes grupos; valores de  $p$  determinados pelo teste de Mann-Whitney.**

#### 4.4.6.5 Análise de correlação entre citotoxicidade induzida pelas células NK e a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$ ou IL-10

A análise de correlação de CTX de células NK foi feita em relação à frequência de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, em células NK e subpopulações, e suas intensidades de expressão (MFI), frente a células K562 e a frente células K562 bloqueadas para MICA. Os valores de  $r$  e  $p$  foram determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

- **CTX contra células K562 vs CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10**

As únicas correlações observadas foram em relação à molécula **CD107a**, em ambos os grupos, EDT e CTR:

- ▶ **Grupo CTR**: tivemos correlações positivas entre CTX e a % de células CD56<sup>bright</sup> ( $r=0,5$ ,  $p=0,0397$ ) e CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,8$ ,  $p=0,001$ ) e entre **CTX e intensidade** de expressão de **CD107a** em células CD56<sup>dim</sup> ( $r=0,5$ ,  $p=0,0405$ ) (Tabela 23A):

- ▶ **Grupo EDT**: somente observamos correlação positiva de CTX com intensidade de expressão de CD107a na subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $r=0,5$ ,  $p=0,0474$ ) Tabela 24A):

Chama a atenção que a correlação da CTX com % de CD107a para o grupo CTR foi apenas para células com presença da molécula CD56<sup>bright</sup>. Para MFI, em ambos os grupos, a correlação foi para células com baixa expressão da molécula CD56<sup>dim</sup>.

- **CTX contra células K562 bloqueadas para MICA vs CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10**

No ensaio de CTX tendo como célula alvo **K562 bloqueadas para MICA**, houve **perda de todas as correlações para CD107a** (frequência e MFI), tanto na **EDT como em CTRs** (Tabela 23B).

Para **IFN- $\gamma$  e IL-10**, no grupo CTR, foram mantidas as ausências de correlações com CTX. No entanto, **na EDT**, diferentemente do estímulo de células NK com K562 sem bloqueio, no ensaio de CTX com células K562 bloqueadas para MICA surgiram **correlações positivas da CTX com intensidade de expressão de IFN- $\gamma$**  ( $r=0,5$ ,  $p=0,0478$ ) e com a **% de expressão de IL-10** ( $r=0,6$ ,  $p=0,0135$ ), ambas para **células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>** (Tabela 24B).

**Tabela 23.** Análise de **correlação** entre a **citotoxicidade** contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA, com a **frequência ou intensidade de expressão** das moléculas **CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10**, em mulheres do **grupo controle**.

A) CTX contra células K562 no grupo controle

Subpopulações	Estímulo com K562 (frequência de expressão, %)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	19	ns	ns	19	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	19	ns	ns	19	ns	ns	15	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	<b>0,0397</b>	<b>0,5</b>	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	<b>0,0010</b>	<b>0,8</b>	14	ns	ns	12	ns	ns

Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	19	ns	ns	19	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	19	<b>0,0405</b>	<b>0,5</b>	19	ns	ns	13	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	14	ns	ns	12	ns	ns

B) CTX contra células K562BLOQ no grupo controle

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (frequência de expressão, %)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	18	ns	ns	18	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	13	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	14	ns	ns	13	ns	ns	10	ns	ns

Subpopulações	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	18	ns	ns	18	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	13	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	14	ns	ns	13	ns	ns	10	ns	ns

CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562BLOQ: células K562 bloqueadas para a proteína MICA; n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; as análises foram realizadas a partir de valores da mediana de porcentagem de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 e de suas MFIs, nas diferentes subpopulações de NK; ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de  $r$ ; valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

**Tabela 24. Análise de correlação entre a citotoxicidade contra células K562 e K562 bloqueadas para MICA, com a frequência ou intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10, em mulheres com endometriose.**

A) CTX contra células K562 no grupo endometriose

EDT	Estímulo com K562 (frequência de expressão, %)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	ns	ns	4	ns	ns	4	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
EDT	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	<b>0,0474</b>	<b>0,5</b>	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	ns	ns	4	ns	ns	4	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns

B) CTX contra células K562BLOQ no grupo endometriose

EDT	Estímulo com K562BLOQ (frequência de expressão, %)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	<b>0,0135</b>	<b>0,6</b>
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	ns	ns	4	ns	ns	4	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
EDT	Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)								
	CD107a x CTX			IFN- $\gamma$ x CTX			IL-10 x CTX		
	(n)	p	r	(n)	p	r	(n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	<b>0,0478</b>	<b>0,5</b>	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	ns	ns	4	ns	ns	4	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns

EDT: grupo endometriose; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); K562BLOQ: células K562 bloqueadas para a proteína MICA; n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; em negrito: valores de p significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de r; as análises foram realizadas a partir de valores da mediana de porcentagem de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  ou IL-10 e de suas MFIs, nas diferentes subpopulações de NK; ns: não significativa ( $p \geq 0,05$ ; valores de p e r determinados pelo teste de correlação de Spearman).

***DISCUSSÃO***

---

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo corroboram nossa hipótese do papel da molécula MICA na fisiopatologia da endometriose e que MICA solúvel pode contribuir para a deficiência da atividade citotóxica de células NK, na doença. Como balanço geral, nossos dados mostraram que o endométrio eutópico de mulheres com EDT apresentam uma maior frequência de alta expressão da proteína MICA em contraste ao endométrio saudável, indicando já haver alterações imunológicas de células endometriais, com envolvimento de MICA, mesmo antes da sua migração e instalação ectópica. Observamos maiores níveis de MICA solúvel, sistêmicos e no microambiente peritoneal, na EDT. Esses níveis foram associados a estádios avançados e a sítios de maior gravidade da doença, sugerindo a participação de MICA solúvel na sua gravidade e, possivelmente, na progressão da doença.

Além disso, mulheres com EDT apresentaram menor citotoxicidade pelas células NK, deficiência essa também associada a estádios avançados da doença, em concordância com dados da literatura e indicando a maior deficiência da atividade funcional de NK, provavelmente, também na progressão da EDT. A menor frequência da subpopulação com propriedade citotóxica, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, soma-se ao achado de menor citotoxicidade na doença. Ademais, a maior expressão do receptor NKG2D nas células NK, apenas nos estádios iniciais da EDT, pode implicar em maior estímulo de ativação das nessas células, em fases mais precoces da doença. Testamos o potencial efeito de MICA solúvel na atividade efetora de células NK, por meio do experimento de bloqueio de MICA, *in vitro*. O bloqueio de MICA impactou numa menor citotoxicidade comparada ao estímulo sem bloqueio, apenas em mulheres em estádios iniciais da doença, em relação às mulheres saudáveis, sugerindo o envolvimento de MICA solúvel na deficiência da atividade citotóxica de células NK, nos estádios iniciais da doença.

No estado basal de cultura, mulheres com EDT apresentaram maior expressão da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  e da citocina imunorreguladora IL-10, nas células NK, refletindo o estado inflamatório da doença, com impacto nas células NK. A menor expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas células NK e sua menor citotoxicidade, na condição de estímulo, indica haver deficiência na ativação dessas células, na EDT, quando desafiadas com estímulo. A condição de bloqueio para MICA, mimetizando o efeito de MICA solúvel, não alterou a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas células NK, indicando pouco impacto na expressão dessas moléculas, por células NK, nem na EDT nem em mulheres saudáveis, pelo menos *in vitro*. No entanto, a correlação negativa entre níveis de MICA solúvel (*in vivo*) e a expressão de CD107a, apenas na condição de bloqueio de MICA, na EDT, sugere que, *in vivo*, MICA solúvel pode contribuir para a inibição da degranulação das células NK na doença, prejudicando sua atividade citotóxica.

Agora, discutiremos nossos dados de forma mais aprofundada, procurando estabelecer interconexões entre eles, visando melhor interpretação biológica, assim como com a literatura.

Com o objetivo de avaliar a potencial participação de MICA na fisiopatologia da EDT, analisamos, inicialmente, sua expressão gênica no endométrio eutópico de mulheres com EDT e comparamos com o grupo CTR saudável. Nossos resultados indicaram não haver diferença na expressão gênica de MICA entre os grupos de estudo. Este dado sugere que a expressão gênica de MICA em mulheres com EDT se mantém semelhante à condição fisiológica, a despeito do endométrio dessas mulheres apresentarem diversas alterações, como funções imunológicas e endócrinas, num contexto inflamatório, em relação a mulheres sem doença (Sharpe-Timms, 2001; Ulukus *et al.*, 2006). Mesmo considerando a escassez de estudos analisando a expressão gênica e proteica de MICA no endométrio eutópico, na EDT, identificamos um estudo (Xu, 2019) que foi concordante com a ausência de diferença de expressão de mRNA de MICA, aqui observada. A expressão gênica de MICA, nesse estudo, também não indicou diferença em relação ao endométrio ectópico. Nesse sentido, destacamos que, embora consideremos relevante a análise pareada da lesão endometrial para o estudo de expressão gênica de MICA, optamos por não realizar esta análise, devido à dificuldade técnica para a obtenção de tecido endometrial puro da lesão, não sendo, portanto, uma amostra representativa.

Não obstante, quando realizamos uma análise mais refinada, considerando a expressão proteica de MICA no epitélio (simultaneamente, frequência e intensidade de expressão, que denominamos de escore de imunorreatividade - EIR), encontramos uma maior frequência de alta expressão de MICA no epitélio do endométrio eutópico de mulheres com EDT, em relação ao endométrio de mulheres saudáveis. Esse dado sugere que a ocorrência de estímulo prévio nesse endométrio tenha promovido o aumento de expressão da proteína MICA, antes mesmo de seu deslocamento e desenvolvimento ectópico.

Tal estímulo pode estar relacionado ao próprio microambiente do endométrio eutópico das mulheres doentes, como já descrito antes, ter maior expressão de VEGF-A, presença de estresse oxidativo, resistência à progesterona, entre outros fatores, caracterizando um microambiente inflamatório (revisado em Brosens *et al.*, 2012). No entanto, permanece em aberto o que desencadeia o processo inflamatório e onde ele se inicia. Assim, em concordância com outras alterações relatadas para o endométrio eutópico de mulheres com EDT, como disfunções imunológicas e endócrinas (Sharpe-Timms, 2001; Ulukus *et al.*, 2006), nossos dados de maior escore de imunorreatividade de MICA, na EDT, também convergem para a interpretação da quebra da homeostase do microambiente uterino.

Destacamos que a indução e/ou aumento da expressão das moléculas MICA, em situação de estresse biológico, pode estar relacionada com a presença de um segmento do promotor gênico semelhante aos do gene da proteína 70 de choque térmico (HSP70), tendo sua expressão regulada por tais elementos (Groh *et al.*, 1996). No contexto da EDT, também é descrito que a proteína HSP70 está mais expressa no endométrio eutópico dessas mulheres, em comparação ao endométrio eutópico de mulheres CTR, sem a doença (Ota *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 2014), e também em relação às lesões ectópicas (Ota *et al.*, 1997). Esses

dados colocam a HSP70 como uma possível molécula importante na modulação positiva da expressão de MICA, no contexto de estresse celular e da perturbação da homeostase nesse microambiente, na doença. Além disso, a inflamação do endométrio eutópico na EDT está também associada à produção de radicais livres e a sinais de estresse oxidativo (Agarwal *et al.*, 2008), que também estão associados ao aumento de expressão de MICA, e na sua liberação na forma de exossomas (Hedlund *et al.*, 2011), apoiando nossa interpretação.

Ademais, é possível que os maiores escores de imunorreatividade (EIR) para a expressão de MICA no epitélio glandular, em ambos os grupos de estudo, possam também estar relacionados à intensa atividade funcional a ele associado, assim como por uma possível ação autócrina de TGF- $\beta$  produzido por esse epitélio, e que poderia também contribuir para a indução de maior expressão de MICA (Song *et al.*, 2015). Em alguns estudos sugerem-se o potencial envolvimento de TGF- $\beta$  na patogênese da EDT, participando na sobrevivência de endométrio ectópico, aumentando a proliferação celular, podendo facilitar a capacidade invasiva do endométrio (Shin-ichi Komiyama *et al.*, 2007)

Ainda no que diz respeito à expressão proteica de MICA, esperávamos encontrar maior expressão no endométrio ectópico da lesão, em relação ao eutópico, na EDT. No entanto, apesar de não termos observado essa diferença, não podemos descartar que, em algum momento da evolução da doença, tenha havido uma maior expressão de MICA e, no contexto de intenso processo inflamatório, tenha ocorrido maior liberação na sua forma solúvel, seja por clivagem via MMPs e ADAMs, detectadas em maior expressão na EDT (revisado em Ke *et al.*, 2021), ou via exossomas (Whiteside, 2013).

Um estudo da literatura sobre a expressão proteica de MICA na EDT (Xu 2019) indicou, diferentemente do nosso resultado de expressão proteica, ausência de diferença na expressão de MICA entre o endométrio eutópico de mulheres com EDT e o do grupo CTR. Destacamos que essa diferença pode ser devido às diferentes abordagens técnicas utilizadas nos estudos. Ademais, salientamos que, diferentemente dos nossos grupos de estudo (EDT e CTR), a análise de expressão gênica e proteica desse estudo (Xu 2019) foi realizada em endométrios eutópicos de mulheres apenas com EDT ovariana e, no grupo CTR, em endométrio eutópico de mulheres com presença de doença benigna (cisto ovariano), não havendo o parâmetro do endométrio saudável.

As mulheres com EDT também tiveram níveis maiores de MICA solúvel (sMICA), tanto sistemicamente (no soro) como no microambiente da lesão (fluido peritoneal), do que mulheres do grupo CTR, indicando haver desregulação da imunobiologia de MICA, na doença. De maneira complementar, analisamos os níveis de sMICA em relação aos estádios e tipos de doença.

No entanto, inicialmente, gostaríamos de apontar a vigente discussão, na comunidade científica, sobre quais parâmetros são adequados para avaliar a progressão da doença em mulheres com EDT. Embora haja limitações nos modelos animais disponíveis para EDT, devido à etiopatogenia multifatorial da doença, alguns modelos indicam a ocorrência de

progressão da doença (revisado em Bruner-Tran *et al.*, 2018). Após a implantação ectópica de células endometriais, há progressão da lesão, no entanto, não encontramos dados sobre a atividade imunológica nesses modelos. Ademais, dados em mulheres com EDT também sustentam a interpretação de haver progressão da doença. Em estudo avaliando-se a citotoxicidade pré e pós a remoção total, ou parcial, das lesões de EDT avançada (Garzetti *et al.*, 1995), mostrou-se haver manutenção da deficiência de citotoxicidade na EDT, em relação ao grupo controle. A deficiência de citotoxicidade permaneceu onde houve remoção macroscópica total da lesão, indicando permanência da disfunção imunológica. Salientamos que a avaliação imunológica foi realizada com 4-8 semanas pós-cirurgia, não sendo possível, portanto, saber se a homeostase imunológica poderia ser resgatada posteriormente. Ademais, destacamos que a avaliação da lesão é macroscópica, não sendo possível excluir a permanência de lesão residual microscópica (Garzetti *et al.*, 1995). Com base nesses dados, interpretamos que a EDT pode cursar com progressão e maior gravidade.

Nossos resultados mostraram maiores níveis de sMICA a partir do estágio II (leve) da doença, sendo mantido nos estágios mais avançados da doença, III (moderado) e IV (grave), tanto no soro, como no FP, em relação ao grupo CTR. Em contraste, não foram observadas diferenças entre os níveis de sMICA de mulheres com EDT que estavam no estágio inicial I (endometriose mínima) e mulheres CTR, sugerindo que os níveis de sMICA, nesse estágio, sejam insuficientes para inibir a atividade citotóxica de células NK, descrita ser pouco comprometida neste estágio da doença (Wilson *et al.*, 1994). Na análise estratificada por estágio, identificamos diferenças, tanto sistemicamente (no soro) como no microambiente peritoneal (FP), entre os estágios I e II, e I e IV. De forma geral, esses resultados indicam uma associação de maiores níveis de sMICA com estágios mais avançados da doença e sugerem que o excesso de sMICA pode contribuir para a progressão da doença.

Salientamos que o excesso de sMICA pode contribuir para a internalização/degradação do receptor NKG2D (Groh *et al.*, 2002), via ligação sMICA-NKG2D, e contribuir para a menor atividade efetora de células NK e, conseqüentemente, para o maior comprometimento na eliminação de células endometriais ectópicas. Ademais, esses dados, especialmente, em relação ao microambiente da lesão (FP), com maiores níveis de sMICA, sustentam a nossa hipótese do potencial envolvimento de MICA, também na forma solúvel, na fisiopatologia da doença e, especialmente em seus estágios avançados.

É possível que os maiores níveis de sMICA no FP de mulheres com EDT sejam reflexo do microambiente inflamatório do peritônio dessas mulheres, como relatado ter presença aumentada de células do sistema imune, como macrófagos, células TCD4+, TCD8+ e células NK (Osuga *et al.*, 2011; revisado em Ulukus *et al.*, 2006) e de diversas citocinas inflamatórias (Podgaec *et al.*, 2007; Bellelis *et al.*, 2019). De forma não excludente, devemos considerar que, ao menos em parte, os maiores níveis de sMICA sejam induzidos pelas citocinas TGF- $\beta$  e IL-15, bem como por espécies reativas de oxigênio (ROS) e pela ação conjunta de MMPs. Vale destacar que a citocina TGF- $\beta$  é descrita com maior expressão proteica no epitélio

glandular de cistos endometrióticos de mulheres com EDT, em relação a endométrios normais (Komiyama *et al.*, 2007) e que seus níveis, tanto no soro como no FP, foram associados, de forma progressiva, a estádios mais avançados da doença (Pizzo *et al.*, 2002). Além disso, salientamos que TGF- $\beta$  tem a capacidade de estimular a expressão proteica de MICA, bem como sua liberação na forma solúvel (SONG *et al.*, 2015). Ademais, também a citocina IL-15 é expressa em maiores níveis (mRNA e proteína) no endométrio ectópico (Chegini *et al.*, 2003) e é capaz de induzir a expressão de MICA (Van Audenaerde *et al.*, 2017; Jinushi *et al.*, 2003). Além disso, a IL-15 é observada em níveis elevados no FP de mulheres com EDT, quando comparados aos de mulheres CTRs (Chegini *et al.*, 2003; Bellelis *et al.*, 2019).

Em relação ao microambiente peritoneal de mulheres com EDT, o aumento de sMICA pode ter ocorrido posteriormente a uma expressão inicial aumentada de MICA de membrana, dentro de um contexto inflamatório continuado (estresse biológico), com liberação sincronizada na sua forma solúvel e, portanto, não mais detectável, como aumentada, nas células endometriais. Também vale a pena apontar que o ferro, proveniente de refluxo menstrual, potencializa a toxicidade de oxigênio e nitrogênio, pela liberação de radicais livres, induzindo dano celular e proliferação (Kumar e Beyopadhyay, 2005). A liberação dos produtos pró-inflamatórios e os sinais de estresse oxidativo gerados por espécies reativas de oxigênio (ROS) podem estimular a expressão de moléculas MICA (Peraldi *et al.*, 2009), amplificando o microambiente inflamatório.

As células endometriais aderidas ao peritônio, ou a outras superfícies de órgãos peritoneais, uma vez expressando MICA, poderiam sofrer a ação de MMPs, levando à liberação de MICA na forma solúvel, no FP (revisado em Kyama *et al.*, 2003). Depois da ligação ao peritônio, as células endometriais invadem a matriz extracelular, num processo, principalmente, mediado por metaloproteinases. As MMPs são produzidas por tecido endometrial eutópico e ectópico e parecem participar de forma ativa no estabelecimento e progressão da doença (revisado em Zhou e Nothnick, 2005). Neste sentido, foi observado que implantes endometrióticos têm alta expressão de diversas MMPs, incluindo MMP2 e MMP9 (revisado em Zhou e Nothnick, 2005), as quais são mediadoras da clivagem de MICA para a forma solúvel (Yang *et al.*, 2014). Ademais, as MMP2/9 têm função imunorreguladora (Lavini-Ramos *et al.*, 2017) e poderiam contribuir para o estado de imunossupressão que ocorre na EDT, especialmente na EDT avançada (Rached *et al.*, 2019).

Além do fluido peritoneal, também encontramos maiores níveis de MICA solúvel no soro, na EDT, indicando haver uma repercussão sistêmica da desregulação envolvendo MICA solúvel, concordante com a interconexão entre circulação e microambiente peritoneal (Solass *et al.*, 2016). Isto é, o peritônio consiste em uma camada de células mesoteliais, em uma base de tecido conjuntivo, perfundida com vasos sanguíneos e linfáticos (Solass *et al.*, 2016), de forma que sMICA presente nesse microambiente pode seguir, via circulação sanguínea e ser detectada sistemicamente (no soro). Além disso, o aumento da angiogênese/vascularização, que ocorre nos locais de implante de tecido endometrial (Tariverdian *et al.*, 2007), também

pode favorecer a circulação sistêmica dessa proteína. A correlação positiva que encontramos entre os níveis de sMICA no soro e FP, em ambos os grupos de estudo, é concordante com essa interpretação.

Destacamos já ter sido relatado, na literatura, que o tratamento de células NK com soro de mulheres com EDT, com altos níveis de sMICA observado no presente estudo, diminui a atividade citotóxica dessas células, de maneira dose dependente, comparando-se ao tratamento com soro de mulheres saudáveis (Kanzaki *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992). De forma semelhante, fatores solúveis presentes no sobrenadante de cultura de células estromais de endométrio de mulheres com EDT são capazes de suprimir a atividade citotóxica de células NK (Somigliana *et al.*, 1996). Estes achados apoiam o envolvimento de fatores solúveis na deficiência da atividade citotóxica de células NK e reforçam a nossa hipótese do potencial envolvimento de MICA solúvel na fisiopatologia da EDT.

De forma semelhante ao grupo EDT, mas em níveis menores, os níveis de sMICA no microambiente peritoneal (FP) de mulheres CTRs (laqueadura e doença benigna) também foi maior do que os níveis encontrados, sistemicamente, nessas mulheres. Nesse sentido, podemos sugerir que sMICA tenha papel fisiológico na manutenção da homeostase, inclusive no ambiente peritoneal. Nossos achados de níveis de sMICA, no grupo CTR, estão em concordância com outros estudos que identificaram sMICA no soro mulheres saudáveis (Bargostavan *et al.*, 2016; Arreygue-Garcia *et al.*, 2008). Ademais, a presença de sMICA no FP de mulheres CTR com presença de doença benigna, mas, sem EDT, também foi relatada (González-Foruria *et al.*, 2015). Como acima citado, nosso grupo de mulheres CTRs foi constituído por mulheres saudáveis, provenientes de laqueadura tubária, e de mulheres com doença benigna, mas sem diferença na expressão de sMICA (no soro e FP) entre esses dois grupos, sendo considerado um grupo CTR adequado para o estudo.

Outra importante questão analisada neste estudo foi a relação entre os níveis de sMICA e os tipos doença, superficial, ovariana e doença profunda. A ausência de perfil diferencial dos níveis de sMICA entre os diferentes sítios da doença, sugere que o ambiente inflamatório parece se manter semelhante quanto aos estímulos à expressão de MICA, nos diferentes tipos de doença. Ou seja, nossos resultados nos levam a pensar que a expressão constitutiva de MICA na superfície de células endometrióticas, independentemente do local de acometimento da doença, poderia funcionar como uma fonte contínua de MICA solúvel que, ligando-se ao seu receptor NKG2D, favoreceria a sua internalização e subsequente degradação lisossomal. Porém, é relevante apontar que, quando comparamos os níveis de sMICA de mulheres com diferentes tipos/sítios de localização da doença, em relação ao grupo CTR, observamos níveis progressivamente maiores, de acordo com os tipos descritos como mais graves da doença (Koninckx *et al.*, 1991; Tosti *et al.*, 2015), a saber: ovariana, doença profunda e doença profunda na presença de doença ovariana. Os maiores níveis de sMICA foram ainda identificados no microambiente inflamatório da lesão (fluido peritoneal) em mulheres com acometimento ovariano e profundo. Frente a esse resultado, podemos

interpretar que MICA pode estar envolvida na fisiopatologia da doença e associada a contextos inflamatórios progressivos, de acordo com o tipo/localização da doença

É interessante apontar que, na doença SUP, considerada a mais leve (Cornillie *et al.*, 1990), não observamos níveis diferenciais de sMICA em relação aos CTRs, sugerindo um menor potencial de comprometimento da atividade citotóxica de células NK, mediado, ao menos em parte, pela interação sMICA-NKG2D. Implantes superficiais são considerados estádios iniciais da doença (Cornillie *et al.*, 1990), corroborando nossos resultados de ausência de diferença dos níveis de sMICA (no soro e FP), entre EDT superficial e CTRs. Ressaltamos que, dos 13 casos de doença SUP, em nosso estudo, 11 (85%) estavam em estágio I. Considerando esses desfechos, é possível interpretar que os níveis equivalentes de sMICA entre a doença SUP e CTRs levariam a um menor comprometimento na eliminação de células endometrióticas viáveis na cavidade peritoneal, via citotoxicidade de células NK e TCD8+. Nossos resultados de maiores níveis de sMICA, especialmente nas doenças consideradas mais graves, reforçam a interpretação da participação de sMICA na fisiopatologia da EDT, e apoiam os dados da literatura de maior comprometimento da atividade de células NK nas formas mais graves da doença (Oosterlynck *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994; Garzetti *et al.*, 1995).

Em concordância com nossos resultados, em outro estudo, também foram observados maiores níveis de sMICA no FP de mulheres com EDT, em relação ao grupo CTR, sem a doença (González-Foruria *et al.*, 2015). Neste estudo também observaram que os maiores níveis de sMICA, no FP, estiveram associados à doença profunda, em relação ao grupo CTR. No entanto, diferentemente dos nossos achados, neste estudo, não foi observada diferença em relação à doença OVA. Não obstante, foi concordante quanto aos níveis semelhantes de sMICA entre a doença SUP e CTRs. É importante salientar que, neste estudo, 40% das mulheres, tanto do grupo EDT e como do CTR, estavam em uso de hormônio, o que poderia, por si, gerar um estímulo à expressão de MICA (Basu *et al.*, 2008). Além disso, para a análise dos dados, os autores (González-Foruria *et al.*, 2015) excluíram os níveis de sMICA considerados indetectáveis, gerando um viés aos resultados encontrados. Salientamos que nesse estudo não foram avaliados os níveis sistêmicos de sMICA (soro). Ademais, diferentemente de nossos achados, em outro estudo (Guo *et al.*, 2016) não se observou diferença na expressão de sMICA no FP de mulheres com EDT profunda e ovariana, em relação às mulheres com doença benigna, tampouco em relação aos estádios da doença. É possível, que neste estudo, os níveis de sMICA observados no grupo CTR, composto apenas por mulheres com doença benigna, não tenha sido possível discriminar uma possível diferença entre os estádios da doença. Salientamos que, apesar de nosso grupo de estudo para avaliação de níveis de sMICA ter sido composto por mulheres sadias provenientes de laqueadura tubária e também de mulheres com doença benigna, não houve diferença significativa dos níveis de sMICA entre esses grupos, sendo, portanto, consideramos um grupo controle adequado para este estudo.

A despeito das limitações para se avaliar a progressão da endometriose na história natural da doença, frente aos nossos achados, consideramos ser válida a interpretação de que a molécula MICA solúvel possa estar envolvida no processo de progressão/gravidade da EDT. Consideramos que os dados de MICA solúvel, apresentados em nosso estudo, fortalecem a interpretação dessa molécula ter potencial de modular, negativamente, a atividade funcional de células NK, possivelmente, promovendo a diminuição da expressão do receptor NKG2D. Esse mecanismo pode contribuir na ineficiência da eliminação de células endometriais do microambiente peritoneal, por meio de células NK, facilitando o estabelecimento e desenvolvimento da endometriose

Para avaliar se havia uma deficiência quantitativa de células NK, ou de suas subpopulações, contribuindo para a menor da atividade NK descrita na EDT (Oosterlynck *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992), analisamos as porcentagens de tais células circulantes, na condição *ex vivo*. Observamos diferença apenas para a subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, com menor frequência em mulheres com EDT. Considerando que esta subpopulação é descrita ter maior capacidade citotóxica em relação às células CD56<sup>bright</sup> e, por expressar o receptor de Fc (FcγRIIIA - CD16), que pode também mediar citotoxicidade dependente de complemento (ADCC) (Cooper *et al.*, 2001b; Vivier *et al.*, 2008), interpretamos que sua menor frequência no sangue periférico possa também contribuir, ao menos em parte, para a deficiência de citotoxicidade pelas células NKs, descrita na doença (Oosterlynck *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994). Salientamos que a subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> compreende, aproximadamente, 90-95% do total de células NK circulantes, enquanto a subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK, com maior propriedade de produção de citocinas, compreende, aproximadamente, 5-10% do total de células NK circulantes (Vivier *et al.*, 2008). Vale destacar que, a deficiência quantitativa não é global e sim de uma subpopulação de células NK.

Além dos dados apresentados, ressaltamos que quando a frequência das subpopulações foi estratificada por estágio, observamos uma menor frequência de células NK totais e, mais uma vez, das subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>dim</sup> com expressão de CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) em estádios iniciais doença (I e II). Esses resultados sugerem que, além do envolvimento na menor atividade funcional dessas células na EDT, a menor frequência dessas células, com propriedade citotóxica, pode ter envolvimento na progressão da doença. Uma menor frequência em estádios menos graves, poderia somar na disfunção de células NK, dificultando a eliminação de células endometriais ectópicas e facilitando sua implantação e estabelecimento da doença. No entanto, surge a pergunta sobre por que não observamos tal diferença também em estádios avançados?

É possível que, com a progressão da doença e maior declínio da capacidade efetora de células NK, como relatado, mesmo sem haver deficiência quantitativa das células NK na EDT avançada, a sua alteração funcional, aliada a outras disfunções imunológicas, componham um cenário desfavorável ao controle do processo inflamatório.

Quando comparamos com a literatura, encontramos dados discordantes sobre a frequência de células NK no sangue periférico. Foram observadas tanto porcentagens maiores de células NK (fenótipo CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) no sangue periférico de mulheres com EDT profunda de retossigmóide e em estádios avançados (II/IV), em relação a estádios iniciais e ao grupo CTRs, sem EDT (Dias *et al.*, 2012), como também ausência de diferença quantitativa (Ho *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 2005) dessas células, na comparação com CTRs, sem a doença. Também para a frequência de células NK, no fluido peritoneal, não há uma homogeneidade de resultados, havendo relatos de maiores porcentagens em estádios iniciais da EDT (Hill *et al.*, 1988) e também ausência de diferença (Ho *et al.*, 1995), em relação ao grupo CTR, sem a doença. No entanto, a variação quantitativa de células observada entre esses estudos, pode, possivelmente, ser devida a diferenças técnicas na caracterização dessas células, bem como diferentes grupos de estudo.

Na análise da expressão do receptor de ativação, NKG2D, observamos um perfil diferencial de maior expressão na EDT, que também foi associado a estádios iniciais da doença (I/II, gravidade mínima e leve), na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, em relação às mulheres CTRs saudáveis. A maior expressão de NKG2D em estádios iniciais, pode ser interpretada como um possível mecanismo que envolva uma maior ativação de células NK e sua maior mobilização, especialmente no início da doença, possivelmente devida a uma resposta imune mais competente dessas mulheres, por células NK, ao menos, via esse receptor. Em acordo com esta hipótese, sugere-se que mulheres com EDT inicial podem ser imunologicamente mais ativas do que as que estão em estádios mais avançados da doença (Odukoya *et al.*, 1996).

Considerando nossos dados, a maior expressão de NKG2D, somada à maior frequência de alta expressão de MICA no endométrio eutópico de mulheres com EDT, sugere um contexto que favorece a ativação continuada das células NK. A maior ativação de células NK, e mesmo de células TCD8<sup>+</sup>, que também expressam NKG2D (Pardoll, 2001), pode favorecer a resposta imune inata e adaptativa, via a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que medeiam a migração de macrófagos, apresentação antigênica por DCs e ativação de células T, contribuindo para a amplificação do processo inflamatório da doença, mesmo que sem capacidade resolutive. Em concordância com esta interpretação, em um estudo com modelo experimental de carcinoma hepatocelular em camundongos deficientes para o receptor NKG2D, comparado com camundongos não deficientes (*wild type*), sugere que a expressão desse receptor pode levar a uma alta produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-12) e acúmulo de células NK, células T *natural killer* (NKT) e macrófagos (Sheppard *et al.*, 2018).

Além disso, uma vez que a ligação MICA solúvel (sMICA)-NKG2D pode resultar na modulação negativa (internalização) de NKG2D, avaliamos também a existência, ou não, de correlação entre os níveis de sMICA, *in vivo*, e a expressão de NKG2D em células NK. Observamos correlações negativas sistemicamente (soro) apenas nas mulheres com

endometriose, tanto para frequência como para a intensidade de expressão (MFI) de NKG2D. Esta correlação negativa pode indicar que, mesmo com maior expressão desse receptor na doença, a ativação celular pode não ser eficiente, frente aos maiores níveis de MICA na forma solúvel, provavelmente, impactando negativamente na sua menor expressão, no decorrer da evolução da doença. A variação quantitativa inversa dessas moléculas sugere que a presença de maiores níveis de MICA solúvel, apenas na EDT, pode regular negativamente este receptor, via sua internalização. Este resultado pode compreender um mecanismo de evasão imune na doença, por células NK e também de TCD8+, via receptor NKG2D, contribuindo para a diminuição da capacidade de eliminação de células endometriais ectópicas. Além disso, esses dados são concordantes com os dados da literatura mostrando diminuição da expressão de NKG2D associada ao aumento de MICA solúvel, no contexto tumoral (Groh *et al.*, 2002; Jinushi *et al.*, 2008). Salientamos que não encontramos outros relatos na literatura sobre qualquer correlação entre a expressão de NKG2D e MICA na forma solúvel, na EDT.

Uma questão central na hipótese testada em nosso estudo é como as diferentes moléculas, relevantes na atividade das células NK, se relacionam com sua atividade citotóxica, e como MICA poderia participar da disfunção imunológica, na EDT. Nesse sentido, analisamos a citotoxicidade pelas células NK, buscando as diferentes potenciais relações com essas moléculas. Esta análise foi realizada na condição de estímulo com as células K562 e na presença de células K562 bloqueadas para MICA (K562BLOQ) na superfície celular, com o objetivo de mimetizar a presença de MICA solúvel, *in vitro*. Relembramos que as células K562 são caracterizadas pela ausência, ou baixa expressão, de moléculas HLA classe I, tornando-as susceptíveis à ação de receptores ativadores de NK (West *et al.*, 1977). Além disso, as células tumorais K562 expressam moléculas MICA (Epling-Burnette *et al.*, 2007) que se ligam ao receptor ativador NKG2D, funcionando como alvo de citotoxicidade por células NK.

Nossos resultados indicaram que mulheres com EDT apresentam uma menor citotoxicidade, especialmente em estádios avançados da doença, em relação às mulheres CTRs saudáveis. Esses achados confirmam os dados da literatura indicando diminuição da atividade citotóxica de células NK na EDT e, mais pronunciada, nas fases moderadas e graves da doença (estádios avançados da doença, III e IV) (Oosterlynck *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1994; Garzetti *et al.*, 1995).

Ademais, com o objetivo de avaliar o potencial envolvimento de sMICA na citotoxicidade de células NK, na EDT, analisamos também a citotoxicidade por células NK frente ao estímulo com bloqueio para MICA, nas células alvo. O bloqueio não alterou a citotoxicidade previamente observada, na condição sem bloqueio, mantendo-se menor na EDT, na comparação com CTRs. No entanto, quando comparamos, tanto os estádios iniciais como avançados da EDT, nas condições antes e após o bloqueio de MICA (mimetizando a presença de MICA solúvel), observamos que o bloqueio diminuiu ainda mais a citotoxicidade, apenas nos estádios iniciais da doença. Além disso, também na condição com bloqueio, apenas mulheres em estádios iniciais tiveram diminuição adicional da citotoxicidade na

comparação com o grupo CTR. Salientamos que essa diferença de menor citotoxicidade em estádios iniciais da EDT, não foi observada na presença de estímulo sem bloqueio. Frente a esses achados, podemos interpretar que mulheres em estádios iniciais da EDT (I/II), as quais apresentam níveis de sMICA, *in vivo*, menores do que mulheres em estádios avançados da doença (III/IV), apresentam uma maior sensibilidade ao bloqueio, com impacto negativo na citotoxicidade, ao menos na condição *in vitro*. Destacamos, como acima descrito, que a maior expressão do receptor de ativação NKG2D em células NK, na EDT, esteve associada a seus estádios iniciais. É possível que os maiores níveis de MICA solúvel *in vivo*, tanto sistêmicos como no microambiente peritoneal, em mulheres em estádios avançados da EDT, identificados neste estudo, possam ter provocado uma saturação de ligações com NKG2D e, talvez, até levado à exaustão das células NK, não permitindo, assim, a detecção de alterações da citotoxicidade, pós bloqueio da proteína MICA, *in vitro*. Além disso, também podemos levantar como hipótese que, *in vivo*, com a progressão da doença e a exposição crônica e continuada das células NK a níveis altos de MICA solúvel, na EDT, possa haver alteração da sensibilidade ao bloqueio, *in vitro*, ou mesmo envolver outros distúrbios imunológicos. De fato, embora não tenhamos observado uma correlação inversa entre os níveis de sMICA (soro e FP) e citotoxicidade por células NK, a menor citotoxicidade identificada em estádios avançados da doença, em relação ao grupo CTR, apoia essa interpretação.

Ademais, embora não tenhamos observado menor citotoxicidade nos estádios iniciais da doença, em relação às mulheres CTRs saudáveis, podemos considerar que as subpopulações CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, caracterizadas por uma maior atividade citotóxica (Cooper *et al.*, 2001a) em relação às células CD56<sup>bright</sup>+, e observadas em menor frequência em estádios iniciais da EDT, em relação aos CTRs saudáveis, podem ter relevância no contexto geral de menor atividade citolítica na doença, aqui observada e confirmada em outros estudos (Tanaka *et al.*, 1992; Garzetti *et al.*, 1995).

De forma complementar à avaliação do potencial papel de sMICA na citotoxicidade por células NK de mulheres com EDT, em experimentos *in vitro*, analisamos também se havia correlação entre a citotoxicidade e os níveis, *in vivo*, de sMICA. A ausência de uma correlação, positiva ou negativa, entre citotoxicidade e níveis de sMICA, tanto sistemicamente como no microambiente peritoneal da lesão (grupo EDT), e também no microambiente peritoneal fisiológico (grupo CTR), corroboram nossos achados de pouco, ou nenhum impacto de sMICA na citotoxicidade de células NK, tanto na EDT, e até mesmo na saúde.

Na ausência de estudos funcionais com esse enfoque de análise, na EDT, podemos destacar que, em diversos tipos de cânceres (Klöß *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2020), há relatos de citotoxicidade por células NK comprometida, na presença de sMICA, e mediada pela ligação sMICA-receptor NKG2D e posterior internalização desse receptor (Groh *et al.*, 2002). No entanto, salientamos que não encontramos correlação entre a citotoxicidade e a expressão do receptor de ativação NKG2D em células NK, sugerindo que, mesmo com a maior expressão

de NKG2D e menor citotoxicidade, na EDT, a frequência desse receptor parece não impactar no balanço final da citotoxicidade de células NK.

Com o objetivo de explorar diferentes vias moleculares da atividade efetora de células NK, avaliamos as expressões das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e também da citocina imunorreguladora, IL-10, em células NK totais e suas subpopulações, frente aos mesmos desafios de estímulos utilizados no estudo de atividade citotóxica (K562 e K562BLOQ). Além da condição com estímulo, a expressão dessas moléculas foi também avaliada na condição sem estímulo, que corresponde à condição basal, provavelmente refletindo o que ocorre *in vivo*, seja no contexto fisiológico (CTR), seja na EDT. A expressão das moléculas CD107a e IFN- $\gamma$  nos traz, de maneira complementar à citotoxicidade, informação sobre a capacidade de degranulação e ativação de células NK, respectivamente, e, a citocina reguladora, IL-10, sobre o potencial papel de células NKreg na imunorregulação da EDT.

Primeiramente, a análise na condição basal, na ausência de estímulo, mostrou que a expressão de CD107a por células NK, e em suas subpopulações, não teve diferença entre os grupos EDT e CTR. Estes dados indicam que a expressão da molécula CD107a não impacta em diferença no potencial na degranulação de células NK, na condição basal, na doença, em relação à condição fisiológica. Esse dado pode ser interpretado como a existência de algum grau de deficiência no processo de degranulação, na EDT, uma vez que na doença há um processo inflamatório em curso, de forma que esperávamos um grau de ativação maior e, no entanto, o nível de degranulação está semelhante ao encontrado na condição fisiológica. Porém, em um estudo observou-se menor expressão da proteína CD107a em tecido endometrial ectópico de mulheres com EDT, em relação ao tecido endometrial eutópico de mulheres CTRs, sem a doença (Lubis *et al.*, 2018). A diferença encontrada entre o nosso estudo (análise por citometria de fluxo), e o estudo da literatura citado (análise por imunohistoquímica), pode estar relacionada às diferentes abordagens empregadas - expressão sistêmica e local, respectivamente - para avaliação da molécula envolvida na degranulação, CD107a.

Ainda em relação à condição basal, sem estímulo, observamos maior expressão de IFN- $\gamma$  e de IL-10, em células NK de mulheres com EDT, do que no grupo CTR saudável. A maior expressão de IFN- $\gamma$ , nessa condição, indica a existência de ativação, em curso, de células NK, corroborando a existência de uma condição inflamatória basal, na EDT. No contexto desse processo imunopatológico, a maior expressão de IFN- $\gamma$ , na doença, pode também indicar a presença de uma regulação positiva, benéfica, ao processamento e apresentação de antígenos endometriais ectópicos por DCs e também recrutamento e ativação de macrófagos. Macrófagos ativados são capazes de produzir mais citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, e IL-12 (Gmyrek *et al.*, 2008) que podem recrutar ainda mais macrófagos, e também células T, para o microambiente peritoneal.

No entanto, apesar do intenso estímulo inflamatório, é relatado que esses macrófagos apresentam uma reduzida capacidade de fagocitose, na doença (Chuang *et al.*, 2009;

Dmowski *et al.*, 1990), com deficiência na eliminação de células endometriais ectópicas, favorecendo a manutenção de um ambiente inflamatório basal descontrolado. Ainda no contexto inflamatório, desencadeado pela maior expressão de IFN- $\gamma$  pelas células NK, também é relatado que, na EDT, os macrófagos do microambiente peritoneal expressam níveis maiores de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e de prostaglandinas derivada de COX-2 (PGE<sub>2</sub>), em relação às mulheres saudáveis (Wu *et al.*, 2002). COX2/PGE2 favorecem a implantação e crescimento de células endometriais ectópicas, bem como contribuem para a angiogênese (Banu *et al.*, 2008) e sintomas clínicos, como de dor e infertilidade na doença (Burney e Giudice, 2012). Desatacamos que tal condição inflamatória envolve não apenas o microambiente peritoneal da lesão, mas também, como mencionamos, o endométrio eutópico dessas mulheres com diversas disfunções, como a resistência à progesterona, expressão de aromatase, maiores níveis de IL-6 (revisado em Burney e Giudice, 2012).

Ainda na condição basal, sem estímulo, numa análise mais refinada, observamos uma maior frequência de células com expressão de IFN- $\gamma$  nos estádios avançados, em relação aos estádios iniciais da doença, e também uma maior expressão de IFN- $\gamma$  em ambos os estádios, em relação ao grupo CTR. Esses achados reforçam nossa interpretação de uma maior condição inflamatória na doença, mais pronunciada, em seus estádios avançados. Embora possamos considerar a ocorrência de ativação de células NK, evidenciada pela maior expressão de IFN- $\gamma$ , em relação aos CTRs, devemos destacar a menor capacidade citotóxica observada nessas mulheres, também em nosso estudo. Essas informações se complementam e indicam que, a despeito da ativação de células NK, no balanço geral, ocorre um prejuízo na capacidade de eliminação de células endometriais ectópicas.

Em relação à citocina imunorreguladora, IL-10, sua maior expressão em células NK de mulheres com EDT, em relação ao grupo CTR, na condição basal, sem estímulo, ocorreu independentemente do estágio da doença. Além disso, destacamos que a maior frequência de expressão de IL-10, tanto na EDT como em CTR, ocorreu na subpopulação CD56<sup>bright</sup>, que inclui as células NKs com propriedade imunorreguladora (Zhang *et al.*, 2006a). No entanto, na comparação entre os grupos, EDT e CTR, a maior expressão de IL-10 foi observada em células CD56<sup>dim</sup>, na EDT. Talvez, a maior expressão de IL-10, na doença, justamente na subpopulação de células NKs com maior propriedade citotóxica, em relação à subpopulação CD56<sup>bright</sup>, possa também contribuir para a deficiência da atividade efetora das células NK. O processo patológico, na EDT, poderia promover um maior estímulo à produção dessa citocina reguladora. Ainda que a expressão de IL-10, por células NK, tenha sido considerada muito baixa, podemos interpretar que as células NK produtoras dessa citocina possam estar implicadas, em algum grau, na regulação negativa da condição inflamatória basal da doença. Nesse contexto, e na qualidade de citocina imunorreguladora, a IL-10, na EDT, pode modular, negativamente, a apresentação antigênica de peptídeos antigênicos oriundos de células endometriais ectópicas, por células DCs, a ativação de células T, bem como a migração de macrófagos, para o microambiente peritoneal da lesão. Essas interpretações, em conjunto,

contribuiriam para o menor *clearance* de tecido endometrial ectópico, por células NK, na doença.

Quando comparamos esses dados com os da literatura envolvendo IL-10, na EDT, alguns estudos indicam ausência de diferença em níveis de IL10 solúvel, tanto no soro como no FP (D'Hooghe *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2019) de mulheres com EDT, na comparação com CTRs. No entanto, concordantes com a maior expressão de IL-10 por células NK, na condição basal, neste nosso estudo, outros estudos observaram maiores níveis de IL-10 no soro de mulheres com EDT, na comparação com mulheres CTR saudáveis e/ou CTR com outras doenças ginecológicas (Suen *et al.*, 2014; Nea *et al.*, 2020), bem como no FP de mulheres com EDT (Podgaec *et al.*, 2007; Jaeger-Lansky *et al.*, 2018). No entanto, destacamos que, nesses estudos, a análise foi de IL-10 solúvel e não nas células NK. Ademais, em alguns estudos em EDT, relata-se que a secreção de IL-10 estimula a proliferação e invasão de células endometriais estromais *in vitro*, bem como o crescimento de lesões ectópicas *in vivo* (Liu *et al.*, 2017). Também foi observado que IL-10 coopera com a citocina IL-17A, promovendo o crescimento, adesão, invasão e implantação de células endometriais estromais ectópicas, e reduzindo a apoptose *in vitro* e *in vivo* (Chang *et al.*, 2017). Esses dados apoiam nossos resultados e a interpretação do envolvimento da IL-10 no estabelecimento e evolução da doença, contribuindo para um perfil regulador das células NK, também associado a um perfil inflamatório, devido, à maior expressão da citocina inflamatória, IFN- $\gamma$ , na mesma condição de análise.

Na busca de uma conexão entre a expressão de IL-10 e moléculas MICA, ainda que não seja um estudo em EDT, vale mencionar que, na presença de IL-10, células tumorais de melanoma apresentaram uma diminuição da expressão de MICA (mRNA e na superfície celular) (Serrano *et al.*, 2011), sugerindo mais um mecanismo de regulação negativa da ativação de células NK, via NKG2D, favorecendo o escape da vigilância imunológica.

Ainda na condição basal, sem estímulo *in vitro*, também observamos uma correlação positiva entre as citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ , apenas na EDT. Considerando o que a condição basal, na doença, provavelmente, reflete o processo fisiopatológico em curso, *in vivo*, embora IL-10 possa regular negativamente a expressão de IFN- $\gamma$ , podemos interpretar que a variação conjunta dessas moléculas, que têm atividades funcionais antagônicas, compreende algum grau de controle do processo inflamatório da doença.

Após a análise da expressão das moléculas CD107, IFN- $\gamma$  e IL-10 por células NKs na condição basal de cultura, sem estímulo, discutiremos agora nossos resultados da expressão dessas moléculas por células NK, frente às células K562.

Para interpretar os resultados dos ensaios realizados *in vitro*, estimulando as células NK das mulheres com EDT, comparativamente às saudáveis, precisamos apontar algumas questões para facilitar as interpretações. Primeiramente, as mulheres com EDT têm diferenças quantitativas em relação às populações de células NK, com menor frequência da subpopulação CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, apresentadas em nosso trabalho. Além disso, essas mulheres

também têm uma condição basal diferencial, provavelmente, refletindo a condição inflamatória *in vivo*. Seu organismo está submetido a estímulos inflamatórios de forma crônica, devido ao processo patológico em curso há algum tempo, enquanto as mulheres CTRs saudáveis, não. Desta forma, quando analisamos os resultados dos diferentes parâmetros imunológicos relacionados às células NK, na condição basal, sem estímulo, *in vitro*, essas questões dever ser consideradas. Por outro lado, quando analisamos os resultados dos diferentes parâmetros de células NK frente a um estímulo *in vitro* – no caso com células K562 - estamos adicionando uma sobrecarga de demanda funcional às células NK, visando verificar a sua capacidade de resposta frente a mais desafios. No contexto da EDT, poderíamos ponderar sobre se as células NKs, que já estão sob constante estímulo *in vivo*, pelo processo fisiopatológico em curso, teriam ainda mais capacidade funcional efetora, para responder a novas demandas. Ambos os grupos responderam ao estímulo, com aumento da expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, exceto para IL-10, no grupo EDT, onde houve diminuição da expressão, mas observamos algumas diferenças importantes. Em relação à molécula CD107a, observamos que todas as subpopulações de células NK tiveram aumento de sua expressão, em ambos os grupos de estudo (exceto na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>). Esse aumento de CD107a pós estímulo, em relação ao estado basal, sem estímulo, teve uma correlação positiva com a atividade citotóxica, tanto na EDT como no grupo CTR, indicando haver preservação da ação sincrônica nessa via de ativação de células NK em ambos os grupos. No entanto, na comparação entre os grupos (EDT e CTR), encontramos uma menor expressão de CD107a, na EDT, nas mesmas subpopulações de células NK. Ademais, essa menor expressão de CD107a, frente ao desafio de estímulo, foi menor em mulheres com EDT em estágio avançado da doença (moderado e grave), tanto na comparação aos estádios iniciais (mínimo e leve) da EDT como ao grupo CTR saudável. Considerando o envolvimento de CD107a na atividade efetora de células NK e seu potencial envolvimento na deficiência da citotoxicidade dessas células, esses dados indicam haver deficiência na degranulação dos grânulos tóxicos, granzima e perforina, por células NK de mulheres com EDT, especialmente em estádios avançados, e com provável contribuição na deficiência na eliminação de células endometriais ectópicas. Portanto, embora as células NK de mulheres com EDT tenham capacidade de degranulação, frente a um estímulo adicional, ela ocorre em menor magnitude do que a encontrada em mulheres CTRs saudáveis.

Assim como observamos para CD107a, todas as subpopulações de células NK (exceto CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>) tiveram aumento de expressão IFN- $\gamma$ , frente ao estímulo, em ambos os grupos de estudo, em relação à condição sem estímulo. No entanto, mais uma vez, na comparação entre os grupos, houve uma menor de expressão de IFN- $\gamma$ , na EDT, em relação ao grupo CTR, nas mesmas subpopulações de células NK. Ademais, essa menor expressão de IFN- $\gamma$  frente ao desafio do estímulo ocorreu tanto em mulheres em estádios avançados como em estádios iniciais da EDT, em relação ao grupo CTR, saudável. Portanto, a menor expressão de IFN- $\gamma$  por células NK, independentemente dos estádios da doença, indica uma

menor ativação dessas células, com possível impacto negativo na resposta imune efetora no microambiente da lesão.

Além disso, a menor expressão de IFN- $\gamma$ , associada à menor expressão de CD107a, nessa mesma condição, indica haver uma resposta efetora deficiente de NK, frente ao estímulo, e destacando uma dupla deficiência da atividade de células NK na EDT: deficiência de atividade via IFN- $\gamma$  e de degranulação. Também é interessante apontar que, apesar da expressão de IFN- $\gamma$  em células NK ser mais alta, na condição basal, do que em mulheres saudáveis, frente ao desafio com células K562, a resposta a resposta de IFN- $\gamma$  das células NK, na EDT, não atinge a magnitude da resposta observada na saúde. Ademais, destacamos que no desafio do estímulo *in vitro*, tanto mulheres em estádios avançados como em estádios iniciais tiveram menor expressão de IFN- $\gamma$ , do que mulheres do grupo CTR, saudáveis. Portanto, a menor expressão de IFN- $\gamma$  por células NK, independentemente dos estádios da doença, confere uma menor ativação dessas células e comprometimento da resposta imune efetora no microambiente da lesão. Destacamos que em um estudo semelhante ao nosso (Muharam *et al.*, 2021) houve resultado discordante a este, com ausência de diferença de expressão de CD107a e IFN- $\gamma$  por células NK, frente às células K562, entre mulheres com EDT e mulheres CTRs saudáveis. No entanto, é possível que essa diferença de resultados possa estar associada ao tamanho amostral analisado naquele estudo, considerado pouco representativo (EDT, n=9; CTR, n=7).

Somando-se a estes resultados e, diferentemente do grupo de mulheres CTRs saudáveis, não encontramos correlação positiva entre a expressão de CD107a e IFN- $\gamma$ , na EDT. Essa ausência de sincronia na cinética de expressão dessas moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK, e apenas na EDT, pode impactar no mecanismo de degranulação e na ativação de células NK, acrescentando novo elemento disfuncional das células NK na doença. Podemos também acrescentar que, considerando que as mulheres com EDT vivem um estímulo inflamatório continuado de células endometriais ectópicas no microambiente peritoneal, é possível que tenha ocorrido uma perda na capacidade de resposta sincronizada das células NK frente aos desafios, talvez por exaustão, ou por outros distúrbios da homeostase celular, ainda não conhecidos. Estes dados contrastam com a correlação positiva dessas moléculas, quando células NK de mulheres saudáveis são desafiadas com estímulo, indicando haver mobilização molecular de forma sincronizada, provavelmente, relevante na ativação fisiológica de células NK.

Ainda na condição de estímulo, analisamos a expressão na citocina reguladora IL-10. No entanto, diferentemente da condição basal, frente ao desafio do estímulo, a expressão de IL-10 por células NK teve respostas opostas nos grupos EDT e CTR. O aumento de IL-10, observado no grupo CTR, sugere que, mesmo frente à ativação de células NK, indicado pelo aumento de IFN- $\gamma$  e CD107a, nesta condição, a expressão da citocina reguladora também aumenta, com provável relevância na manutenção de homeostase. Em contraste, na EDT, frente ao desafio imune, ocorreu diminuição da expressão de IL-10 nas células NK,

corroborando a existência de desregulação das células NK, na EDT, também envolvendo a IL-10, e com possível contribuição para o descontrole da condição inflamatória. Embora essa diminuição da expressão de IL-10 em células NK, pós estímulo, possa sugerir uma manutenção de atividade efetora de células NK, na EDT, devido à ocorrência de aumento de IFN- $\gamma$  e CD107a observado pós estímulo, devemos salientar que, no balanço comparativo final entre os grupos, a menor expressão de IL-10, IFN- $\gamma$  e CD107a na doença, frente ao desafio imune, indica um prejuízo na atividade efetora e reguladora de células NK. Destacamos que essa menor expressão de IL-10, frente ao estímulo com células K562, foi mais acentuada nos estádios iniciais da doença, em comparação com CTRs saudáveis. Esse achado pode indicar a existência de mecanismos imunológicos reguladores diferenciais no início da doença, onde ocorre maior expressão do receptor NKG2D e menor comprometimento da atividade citotóxica de células NK.

Nossos achados de expressão de IL-10, IFN- $\gamma$  e CD107a sustentam a hipótese de ocorrência de algum grau de excesso de atividade imunorreguladora nas células NK, na EDT, promovendo um contexto, simultaneamente, com inflamação descontrolada e imunossupressão. Em seguida, analisamos se há relação entre a variação da expressão da citocina IL-10, em relação à expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora inflamatória de células NK, IFN- $\gamma$  e CD107a. Frente ao desafio do estímulo, assim como observado na condição basal, sem estímulo, observamos uma correlação positiva entre expressão da citocina IL-10 e IFN- $\gamma$ , apenas em mulheres com EDT, sustentando a nossa interpretação de que, *in vivo*, esteja ocorrendo algum grau de regulação ao estímulo continuado da inflamação crônica na doença.

Reforçando a hipótese do potencial impacto de sMICA na deficiência da atividade de células NK na EDT, avaliamos se há correlação entre a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 por células NK, e suas subpopulações, e os níveis *in vivo* de sMICA (soro e fluido peritoneal), frente ao desafio do estímulo. Embora ambos os grupos (EDT e CTR) tenham apresentado aumento de expressão de CD107a pós estímulo com células K562 e que, no balanço final entre os grupos, houve menor expressão de CD107a, na EDT, não observamos correlação entre a expressão de CD107a e níveis de sMICA em ambos os grupos, no soro e FP. Salientamos que, nesta análise, buscamos avaliar se a exposição prévia a níveis diferenciais de sMICA, *in vivo*, tem impacto na capacidade das células NK responderem a um estímulo, *in vitro*. Neste caso, devemos ponderar que as células NK habitaram (*in vivo*) um ambiente biológico com diferentes níveis de sMICA (EDT e saúde), e poderiam impactar em respostas funcionais distintas, dependendo do contexto biológico de maiores ou menores níveis de sMICA.

Desta forma, a ausência de correlação entre CD107a e sMICA, observada na EDT, tanto sistemicamente como no ambiente da lesão, sugere que, mesmo com os maiores níveis de sMICA observados no contexto biológico da doença, não há impacto significativo na resposta de degranulação. No entanto, relembramos que a despeito da capacidade de

responder ao estímulo, com aumento de expressão de CD107a, na EDT, a sua expressão final ainda foi significativamente menor do que na saúde (CTRs). Quando analisamos a correlação entre a expressão de IFN- $\gamma$  por células NK e os níveis, *in vivo*, de sMICA, observamos que ambos os grupos de estudo tiveram correlação negativa. Este dado sugere que maiores níveis de sMICA induzam menor capacidade de ativação das células NK, via IFN- $\gamma$ , ou vice e versa, tanto na saúde e como na doença. Como essa correlação foi encontrada também na condição de saúde (CTR), podemos interpretar que, *in vivo*, sMICA tenha papel na regulação da ativação da produção de IFN- $\gamma$  nas células NK. Ademais, como os níveis de sMICA são significativamente maiores na EDT, é provável que esse seja um mecanismo de regulação negativa de ativação de células NK, *in vivo*, provavelmente mais acentuado, na doença.

Em relação à expressão de IL-10 por células NK e níveis de sMICA *in vivo*, na EDT, não encontramos correlação entre essas moléculas. Este dado sugere que, na doença, a expressão de IL-10 nas células NK não seja regulada pelos níveis de sMICA. Por outro lado, na saúde, observamos uma correlação negativa entre a expressão de IL-10 nas células NK e níveis de sMICA sistêmicos, sugerindo que quando células NK são desafiadas com estímulo, sMICA regule negativamente, também, a expressão de IL-10 na saúde.

Além da análise da expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 frente ao estímulo, foram realizadas análises de expressão dessas moléculas também frente ao estímulo com células alvo bloqueadas para MICA, visando explorar o potencial efeito de sMICA na atividade das células NK. No que diz respeito à validade interna desses nossos experimentos, mimetizando o efeito de MICA solúvel, destacamos que o bloqueio da proteína MICA na superfície de células K562 não foi 100% e nem ocorreu de forma homogênea em todos os experimentos. Mas, não houve variação no padrão de estímulo de células NK que pudesse ser explicada por essa variável experimental, em relação à intensidade de bloqueio.

De forma geral, os resultados com bloqueio não mostraram modificações expressivas na atividade dessas células, na comparação ao estímulo sem bloqueio, independentemente dos estádios da doença. No entanto, devemos considerar que nossos experimentos mimetizam a ação sMICA, *in vitro*, e que não podemos descartar que, *in vivo*, sMICA possa, sim, ter um papel na atividade efetora de células NK. Ou seja, *in vivo*, MICA solúvel poderia atuar em combinação com outros fatores que têm efeito deletério na atividade efetora das células NK. Essa interpretação faz sentido, uma vez que os processos biológicos na saúde e na doença são, na sua grande maioria, complexos, e envolvem a ação coordenada, e mesmo sinérgica, e/ou antagônica, de diversas moléculas e tipos celulares. Nesse sentido, destacamos que a molécula imunorreguladora HLA de classe I não clássica, HLA-G, também na sua forma solúvel, foi observada em níveis maiores no soro de mulheres em estádios avançados da doença (Rached *et al.*, 2019), em relação a mulheres saudáveis, possivelmente contribuindo para o comprometimento da atividade efetora de células NK, na EDT. Ademais, outras moléculas, podem somar a este contexto mais imunorregulador, que pode culminar em algum grau de imunossupressão. A maior frequência do gene *KIR2DL2*, que codifica para o

receptor inibitório KIR2DL2, em células NK, em mulheres euro-descendentes com doença profunda (Marin *et al.*, 2021), bem como do gene KIR2DL1 (Matsuoka *et al.*, 2005), também apoiam o envolvimento de outras moléculas no contexto de menor ativação de células NK, na EDT.

Não obstante, a diferença de menor expressão de CD107a, na EDT, na condição sem bloqueio, deixou de existir, pós bloqueio. Isso ocorreu pois, embora sem diferença estatisticamente significativa, houve uma diminuição na expressão de CD107a por células NK no grupo CTR, tornando os grupos sem diferença de expressão de CD107a. Com base nesse achado, podemos interpretar que o grupo CTR saudável, que apresenta níveis fisiológicos de sMICA, e menores do que o grupo EDT, apresenta uma maior sensibilidade ao bloqueio no impacto negativo na expressão de CD107a, ao menos na condição *in vitro*. Concordante com nossos achados de CD107a no grupo CTR, a presença de sMICA em sangue de cordão umbilical humano sadio, também foi descrita como envolvida em menor expressão da CD107a e na atividade citotóxica de células NK contra células K562, sugerindo um mecanismo adicional de tolerância na gravidez (Cox *et al.*, 2015). Podemos levantar como hipótese que, *in vivo*, a exposição continuada das células NK a níveis altos de MICA solúvel, na EDT, pode alterar a sensibilidade ao bloqueio, *in vitro*.

Em relação às citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, também não houve alteração nas suas expressões por células NK, na presença de bloqueio. No entanto, a menor expressão de IFN- $\gamma$ , observada na EDT, tanto na condição de estímulo quanto na condição de estímulo com bloqueio, é ainda mais relevante quando se considera a maior expressão dessa citocina, nas células NK, na condição inflamatória basal, e também na condição *ex-vivo*, na EDT, na comparação com mulheres saudáveis. Ademais, a manutenção da menor expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10, na EDT, com ambos os estímulos (com e sem bloqueio para MICA), sugere a manutenção da menor ativação de células NK e da regulação negativa, por essas moléculas, respectivamente. Esses dados podem indicar que MICA solúvel, representada pelo bloqueio de MICA, em nosso experimento, não tem papel expressivo na variação/sincronia na expressão dessas moléculas. Destacamos que não encontramos outros relatos na literatura sobre a relação de sMICA e a citocina IL-10.

Reforçando a potencial relação de sMICA na deficiência da atividade de células NK, na EDT, avaliamos se há correlação entre os níveis, *in vivo*, de sMICA (no soro e fluido peritoneal) e a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 por células NK, frente ao estímulo com células bloqueadas para MICA, *in vitro*. Consideramos que relacionar os níveis, *in vivo*, de sMICA com a expressão dessas moléculas, na condição de bloqueio, oferece maior sensibilidade para a avaliação do potencial efeito de MICA solúvel na atividade de células NK, uma vez que permite considerar também o efeito do convívio, *in vivo*, das células NK com um ambiente de maiores ou menores níveis de sMICA.

Observamos uma correlação positiva no grupo CTR entre os níveis de sMICA, *in vivo*, no peritônio (pg/mL) e a expressão de CD107a, por células NK, frente ao estímulo com

bloqueio. É possível que, na condição de saúde em ambiente biológico com níveis fisiológicos menores de sMICA, ocorra variação sincronizada, possivelmente, um mecanismo de mútua regulação entre essas duas moléculas (sMICA-CD107a). No entanto, isso não ocorreu de uma forma global, em todas as subpopulações NK. Detectamos a correlação positiva apenas na subpopulação CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, descrita com maior capacidade de produção de citocinas, indicando haver sensibilidade diferencial de diferentes subpopulações de células NK, ao potencial efeito de MICA solúvel. No entanto, vale apontar que o nosso tamanho amostral é limitado, por isso essas interpretações devem ser consideradas com cautela. De forma importante e em contraste com a correlação positiva em saudáveis, na EDT, observamos uma correlação negativa entre MICA solúvel (*in vivo*) e a expressão de CD107a na condição com bloqueio de MICA. Esse dado sugere que, na EDT, a presença de maiores níveis de MICA solúvel poderia contribuir para uma menor degranulação e comprometimento na atividade citotóxica de células NK, como observamos na condição de estímulo.

Ademais, em relação à expressão de IL-10 e níveis de sMICA, *in vivo*, na EDT, na condição de estímulo com células bloqueadas, foi observada uma correlação negativa, não existente na condição sem bloqueio, mas previamente observada, apenas sem bloqueio, em CTRs. Podemos interpretar que, na doença, a presença do bloqueio, representando a oferta de mais MICA solúvel, associada à condição de células previamente já expostas a maiores níveis de MICA solúvel, *in vivo*, gerou uma sincronia inversa da IL-10 e sMICA, diferentemente do observado na condição de estímulo. Uma vez que essa correlação negativa foi observada em ambos os grupos de estudo, mas modificada com o bloqueio, apenas no grupo EDT, podemos interpretar que os níveis, *in vivo*, mais elevados de sMICA, na doença, possam regular negativamente, de forma mais efetiva, a expressão da citocina IL-10 na doença, contribuindo para uma menor regulação da homeostase pelas células NK, e para a manutenção do processo inflamatório envolvido na imunopatologia da EDT.

De forma global, os experimentos com células K562 bloqueadas para MICA, mimetizando a presença de MICA solúvel, indicam que, ao menos *in vitro*, sMICA tem baixo impacto na expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, por células NK, na EDT. As modificações observadas na expressão dessas moléculas, em relação à condição de estímulo sem bloqueio ocorreram, de forma geral, no grupo CTR, onde as células NK estiveram em ambientes biológicos com níveis menores de sMICA. É possível que que, *in vivo*, a exposição continuada das células NK, a níveis altos de MICA solúvel, como ocorre na EDT, possa alterar a sensibilidade dessas células frente ao bloqueio, *in vitro*. Destacamos que a correlação negativa entre MICA solúvel (*in vivo*) e a expressão de CD107a, na presença de bloqueio de MICA, na EDT, indica que MICA solúvel pode impactar, de forma relevante, em menor degranulação por células NK na doença. Ademais, também a correlação negativa entre a expressão de IL10 por células NK, na condição de bloqueio, e níveis de sMICA *in vivo*, sugere que os maiores níveis de sMICA, na EDT, impactam em menor expressão da citocina imunorreguladora IL-10, por células NK, contribuindo para a menor resposta imune reguladora

das células NK, na doença, e manutenção do processo inflamatório imunopatológico nela envolvido.

Avaliamos nossos resultados, também, em relação às fases do ciclo menstrual, na doença e, conseqüentemente, possíveis influências hormonais. No entanto, devemos considerar que há diferenças imunológicas e hormonais importantes, em relação aos diferentes momentos de ambas as fases do ciclo menstrual, introduzindo vieses importantes em relação às interpretações biológicas. Assim, embora sendo um dos objetivos do nosso estudo, devido a essas questões e à uma limitação de tamanho amostral, não consideramos consistente usar os nossos resultados para a elaboração de uma conclusão em relação às fases do ciclo menstrual. Não obstante, discutimos potenciais efeitos hormonais em relação aos nossos resultados de MICA, MICA solúvel e atividade NK, considerando a fase proliferativa com predomínio de estrogênio, e a fase secretora com predomínio de progesterona. Porém, essa discussão deve ser considerada com reservas.

Em relação aos níveis de sMICA, a ausência de diferença entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na EDT (no soro e FP) sugere haver pouco impacto de ação hormonal na regulação dos níveis de sMICA, na doença. Nossos achados foram diferentes de um estudo utilizando linhagem celular de câncer pulmonar, onde foi observado que estrogênio modulou positivamente a ação de ADAM17, resultando em aumento de sMICA (Ren *et al.*, 2015). Na análise comparativa dos níveis de sMICA entre os grupos (EDT vs CTR), os maiores níveis de sMICA, no soro, apenas na fase proliferativa, pode ter relação com os maiores níveis de estrogênio presentes nesta fase do ciclo menstrual (revisado em Hafner *et al.*, 2013). É possível que esse hormônio possa ter promovido um aumento de expressão de MICA e, posteriormente, ocorrido sua clivagem na forma de proteína solúvel. Alguns autores já mostraram que estrogênio aumentou a expressão de mRNA e da proteína MICA, na superfície de células de uma linhagem epitelial uterina e no endométrio uterino de mulheres com doenças ginecológicas, mediada por receptor de estrogênio (Basu *et al.*, 2008). Um possível mecanismo para esse aumento pode estar relacionado ao fato do promotor do gene MICA (posição-46, relativo ao sítio de início de transcrição) possuir uma sequência *consensus* do Elemento de Resposta ao Estrogênio (ERE), em humanos (Basu *et al.*, 2008). O receptor de estrogênio, uma vez ligado com alta afinidade à essa sequência, ativaria, também, a expressão gênica de MICA, em resposta ao estrogênio (Klinge, 2001). Ademais, tanto o tecido endometrial eutópico, como o ectópico, das mulheres com EDT, expressam altos níveis de aromatase (conversora de androgênio em estrogênio), ausente no endométrio de mulheres saudáveis (Kitawaki *et al.*, 2002; Bulun *et al.*, 2001), e baixos níveis da enzima 17 beta-hidroxi-esteróide-desidrogenase-22 (conversora de estradiol em estrona, sua forma menos ativa) (Zeitoun *et al.*, 1998). Também já foi observado que tanto a expressão de mRNA como níveis de MICA/B solúveis de linhagem de adenocarcinoma têm aumento na presença de estrogênio (Ren *et al.*, 2015). Além disso, o estrogênio foi capaz de aumentar a expressão da metaloproteinase ADAM17, que foi associada à secreção de MICA/B, e levou à diminuição do

receptor NKG2D na superfície de células NK92, comprometendo a atividade citotóxica dessas células (Ren *et al.*, 2015), apoiando a hipótese de possível clivagem de MICA gerando a forma solúvel. No entanto, não encontramos uma explicação adequada para a ausência de maiores níveis de sMICA também no ambiente peritoneal (FP), na mesma fase estrogênica do ciclo

Procurando relacionar o contexto diferencial dos hormônios sexuais na atividade efetora de células NK, observamos que a menor atividade citotóxica na EDT, acima descrita, ocorreu na fase proliferativa do ciclo, possivelmente, relacionada aos maiores níveis de estrogênio associados à doença (Bulun, 2009). Apoiando nossa interpretação, o aumento de níveis séricos de estrogênio é descrito ter correlação inversa com a atividade de células NK (Garzetti *et al.*, 1995). Essa menor citotoxicidade por células NK, provavelmente, impacta diretamente no aumento da sobrevivência e implantação de tecido endometrial ectópico. Ademais, esse resultado pode ter relação com os maiores níveis de MICA solúvel observados nessa mesma fase do ciclo, como observado neste estudo.

Também analisamos a expressão das moléculas de atividade efetora NK, CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas condições sem estímulo e com os estímulos com e sem bloqueio para MICA, nas diferentes fases do ciclo. Essa análise teve como objetivo avaliar o potencial envolvimento dos hormônios sexuais na expressão dessas moléculas, associado ao possível impacto de MICA solúvel, representado pelo bloqueio de MICA, na atividade funcional de células NK, na EDT.

Identificamos que a maior expressão de IFN- $\gamma$ , previamente observada na condição basal, sem estímulo, esteve associada à fase proliferativa da doença, podendo estar associada ao aumento de estrogênio nesta fase do ciclo, bem como com a condição inflamatória associada a esta fase do ciclo menstrual, especialmente na inicial e tardia. De fato, estrogênio regula o promotor gênico de IFN- $\gamma$  (Fox *et al.*, 1991) aumentando os níveis dessa citocina (Karpuzoglu-Sahin *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 1991). Ademais, a fase proliferativa (após menstruação) de mulheres com EDT é caracterizada por números aumentados de várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células NK uterinas e DCs imaturas (Matarese *et al.*, 2003). O estímulo inflamatório continuado, devido à presença de células endometriais na cavidade uterina (Berbic e Fraser, 2013), pode estimular a expressão e/ou produção da citocina inflamatória, IFN- $\gamma$ , por essas células, contribuindo para a manutenção da condição inflamatória basal da doença.

Quando analisamos o envolvimento dos hormônios sexuais na expressão das moléculas envolvidas na atividade efetora de células NK, agora na condição de estímulo com células K562, observamos uma resposta diferente da observada na condição basal. Apesar dos maiores níveis de estrogênio nesta fase do ciclo, no desafio do estímulo, mulheres com EDT tiveram menor expressão de IFN- $\gamma$ , nas células NK, do que mulheres saudáveis. Este achado nos leva a interpretar que o estrogênio mantém a maior expressão dessa citocina na saúde, com ativação celular adequada, o que é perdida na doença, na condição de estímulo, na EDT. A presença dos maiores níveis de estrogênio na fase proliferativa do ciclo também

parece ter papel na expressão da citocina imunorreguladora, IL-10, na EDT. Observamos, apenas nesta fase do ciclo, que a expressão de IL-10, por células NK, foi menor na doença do que na saúde (CTR). Este resultado sugere que estrogênio tenha um papel na regulação negativa da expressão de IL-10 nas células NK, na EDT, contribuindo para a perda e/ou diminuição da homeostase na doença, frente ao estímulo. Salientamos que o estrogênio é descrito na literatura com efeitos diferentes, aumentando ou mesmo diminuindo a expressão de IL-10, dependendo do tipo celular envolvido (Lang, 2004). As modificações de menor expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10, observadas na fase proliferativa, na presença de estímulo, em relação à condição basal, na EDT, não foram alteradas na condição de bloqueio para MICA em células K562, sugerindo que sMICA tenha pouco impacto na expressão dessas citocinas, nesta mesma fase do ciclo.

Na fase secretora, quando os níveis de progesterona estão aumentados, não houve diferença na expressão das moléculas envolvidas na ativação de células NK, entre os grupos de estudo, na condição basal, sem estímulo. No entanto, frente ao estímulo, observamos uma menor expressão de CD107a, na EDT, na comparação com CTRs saudáveis, nessa fase do ciclo. Esse dado sugere um impacto negativo da progesterona na degranulação de células NK na doença. A menor expressão de CD107a, na fase secretora, do grupo EDT, pode estar associada à resistência à progesterona já descrita nessas mulheres (Bulun *et al.*, 2006). Lesões endometrióticas apresentam, de forma geral, redução na expressão de receptores de progesterona, e ausência do receptor- $\beta$ , quando comparada à expressão do endométrio eutópico (Attia *et al.*, 2000). De forma indireta, mas concordante com nossos achados, linfócitos da decídua uterina apresentam menor porcentagem de células com expressão de perforina, na presença de progesterona, a qual é liberada de vesículas lisossomais, com exposição da molécula CD107a (Laškarin *et al.*, 2002), indicando efeito negativo da progesterona na citotoxicidade. A menor expressão de CD107a, na EDT, na fase secretora do ciclo foi mantida na condição de bloqueio para MICA, sugerindo que sMICA tenha pouco impacto na expressão dessa molécula, e, possivelmente, na degranulação por células NK, nesta fase do ciclo.

Dentro de uma perspectiva de tradução clínica dos nossos resultados, destacamos que, atualmente, diversas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas com o objetivo de modular a resposta citotóxica de células NK, especialmente contra tumores. (Spear *et al.*, 2013; Schmiedel e Meelboim, 2018; Ferrari de Andrade *et al.*, 2018). Tomando como base tais estudos, e traduzindo para o contexto da EDT, uma das possíveis estratégias, seria a reparação e/ou indução de ligantes para o receptor de ativação NKG2D, especialmente MICA, favorecendo a ativação, tanto de células NK como TCD8 citotóxicas e, dificultando, ao menos em parte, a evasão imune na eliminação de células endometriais fora do útero. Além disso, ainda na perspectiva terapêutica, o bloqueio da liberação de MICA na forma solúvel, ou prevenção dela, por meio de anticorpos ( Ferrari de Andrade *et al.*, 2018) e/ou inibidores de MMPs (Shiraishi *et al.*, 2016) e ADAMs (Otoyama *et al.*, 2021), poderia contribuir para inibir, ou

mesmo restaurar, a expressão de NKG2D, em caso de sua internalização após ligação com sMICA. Consideramos que uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no contexto da deficiência de células NK, e também de células TCD8+, bem como daqueles que regulam a expressão tanto de ligantes como do próprio receptor NKG2D, na endometriose, deve contribuir para estudos de maneira a potencializar a resposta imune na doença.

Em resumo, consideramos que a principal contribuição do nosso trabalho é destacar o papel da molécula MICA na fisiopatologia da endometriose, exercendo, atividades pró-inflamatória e imunorreguladora. Os achados de maior frequência de alta expressão da proteína MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, associados aos altos níveis de MICA na forma solúvel, especialmente na doença avançada e em sítios de maior gravidade, nos permitem concluir que MICA tem um papel relevante na fisiopatologia da doença, bem como possível envolvimento na sua progressão e gravidade. A deficiência da atividade citotóxica somada a alterações da expressão de moléculas envolvidas na atividade efetora - CD107a e IFN- $\gamma$  - e imunorreguladora - IL-10- de células NK, sugere a existência de disfunções, tanto na capacidade efetora como imunorreguladora dessas células. Em conclusão, nosso trabalho contribui para a melhor compreensão da disfunção imunológica na endometriose, colocando a molécula MICA com potencial envolvimento na disfunção das células NK, integrando a fisiopatologia da doença.

***CONCLUSÕES***

---

## 6. CONCLUSÕES

1. A maior frequência de alta expressão proteica de MICA no endométrio eutópico, na endometriose, indica a ocorrência de alterações imunológicas precoces, envolvendo MICA, nas células endometriais, antes mesmo da sua migração e instalação ectópica.

2. Os maiores níveis de MICA solúvel, tanto sistêmicos como no microambiente peritoneal da lesão, na endometriose, sugerem sua participação na fisiopatologia da doença, assim como a prévia ocorrência de alta expressão de MICA de membrana, provavelmente, gerando também repercussão sistêmica.

3. A maior expressão do receptor NKG2D nas células NK, apenas nos estádios iniciais da endometriose, sugere a ocorrência, *in vivo*, de maior estímulo de ativação das células NK, em fases mais precoces da doença, quando ainda há menor prejuízo da atividade citotóxica.

4. A correlação negativa entre a expressão de NKG2D e níveis de MICA solúvel, na endometriose, sugere que os altos níveis de MICA solúvel podem inibir a expressão de NKG2D e, conseqüentemente, a função efetora das células NK.

5. A maior expressão da citocina inflamatória, IFN- $\gamma$ , e da imunorreguladora, IL-10, nas células NK, na endometriose, apenas na condição basal, indica a ocorrência de ativação, *in vivo*, de células NK com perfis INFLAMA e REGULA. A correlação positiva entre a expressão de IL-10 e IFN- $\gamma$ , que têm atividades funcionais opostas, apenas na endometriose, sugere desregulação da atividade das células NK, com prejuízo da sua atividade citotóxica.

6. A menor expressão de CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, em células NK, na endometriose, quando desafiadas com o estímulo, indica a existência de disfunção das células NK, na sua capacidade de resposta efetora, envolvendo a degranulação, a produção de IFN- $\gamma$ , e também a resposta imunorreguladora, com produção de IL10.

7. Observamos menor expressão de CD107a, nas células NK estimuladas, aliada à sua menor capacidade citotóxica e os maiores níveis de MICA solúvel, tanto sistêmicos como no microambiente peritoneal, principalmente na endometriose avançada e em sítios de maior gravidade da doença. Esses dados sugerem que com a maior gravidade e progressão da doença ocorre maior comprometimento da atividade efetora das células NK, inclusive com deficiência de degranulação e participação de MICA solúvel.

8. A menor citotoxicidade induzida pelo bloqueio de MICA em células alvo, apenas em estádios iniciais da endometriose, juntamente com a ocorrência de correlação negativa entre os níveis de MICA solúvel e a expressão de NKG2D nas células NK, sugerem que os altos níveis de MICA solúvel podem inibir a expressão de NKG2D e, conseqüentemente, a função efetora das células NK, principalmente nos estádios iniciais da doença, quando detectamos maior expressão de NKG2D nas células NK.

9. A condição de bloqueio para MICA, *in vitro*, não alterou a expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas células NK, nem na endometriose nem na condição saudável, sugerindo que MICA, na sua forma solúvel, tenha pouco ou nenhum impacto na expressão dessas moléculas, nas células NK, ao menos *in vitro*.

10. A correlação negativa entre níveis de MICA solúvel (*in vivo*) e a expressão de CD107a, nas células NK, apenas na endometriose, e apenas na condição experimental com bloqueio de MICA, sugere que, *in vivo*, MICA solúvel, talvez em ação sinérgica com outras moléculas, desempenhe um papel na inibição da degranulação das células NK.

11. A menor frequência de células NK com o fenótipo CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, na endometriose, sugere que a deficiência quantitativa de células NK com o fenótipo de maior atividade citotóxica, também compõe o conjunto de distúrbios imunológicos na doença.

12. Em conjunto, nossos resultados apoiam a hipótese de que MICA tem participação relevante na imunopatologia da endometriose, podendo exercer papéis, pró-inflamatório e imunorregulador. MICA pode contribuir para geração/manutenção de um estado biológico misto, de inflamação descontrolada e imunossupressão, ineficaz na eliminação adequada de tecidos endometriais ectópicos e no reestabelecimento da homeostase.

**ANEXOS**

---

## 7. 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

## **Continuação – Termo de Consentimento aplicado a pacientes com endometriose.**

### **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, necessitamos 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 necessitarem 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

## **Continuação - Termo de Consentimento aplicado a pacientes com endometriose.**

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

## Continuação - Termo de Consentimento aplicado às mulheres com endometriose.

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](mailto: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 \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**B) Termo de Consentimento aplicado a mulheres do grupo controle****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  XRISCO BAIXO RISCO MAIOR 

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .60 meses

## **Continuação - Termo de Consentimento aplicado a pacientes controles**

### **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, necessitamos 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.

## **Continuação - Termo de Consentimento aplicado a pacientes controles**

### **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.



**ANEXO II: Aprovações do Comitê de Ética referentes ao presente estudo.**

**A) “Banco de Tecidos e Fluidos Corporais de pacientes com endometriose”**



**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 Podgac**

**Dr. João Antonio Dias Junio.**

CAPPesq, 26 de Setembro de 2007

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

**B) Projeto Temático "Endometriose: Bases moleculares da Resposta Imunológica".**



## **APROVAÇÃO**

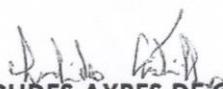
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/07/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0386/11**, intitulado: "**ENDOMETRIOSE: BASES MOLECULARES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**" 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: **Maurício Simões Abrão**

Co-autores: **Edmund Chada Baracat, Jorge Kalil, Mari Cleide Sogayar, Luiz Vicente Rizzo, Carlos Alberto Petta, Sergio Podgaec, Patrick Bellelis, Alessandra Carolina Poppe, Renata Campos Nogueira**

CAPPesq, 15 de Julho de 2011

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

**C) Emenda ao Projeto Temático para o presente projeto de Doutorado.**



**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 16/08/2017, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carla datada de 29/03/2017 - Solicitação de inclusão da Dra. Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho no subprojeto 5 "Papel do Mica na endometriose", Emenda ao protocolo de pesquisa do subprojeto intitulado Papel do Mica na endometriose, que será tese de doutorado da aluna Marla Lucia Aparecida Carnevale Marín sob a orientação da Dra. Verônica Porto Carreiro de Vasconcellos Coelho e co-orientação do Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão, Relatório de andamento do estudo de março de 2017.

CAPPesq, 16 de Agosto de 2017

**Prof. Dr. Alfredo José Mansur**  
**Coordenador**

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

**ANEXO III - Relatório Cirúrgico.**

(Etiqueta)				Equipe:		
Nome:				Cirurgia Realizada:		
Data:	Estadio:	Ciclo:	Endométrio:	Histero:	Exame Físico-Toque:	
AP:	CA125:	DUM:	( ) Normal ( ) Pólipo ( ) Espessamento	( ) Não ( ) Cirúrgica ( ) Diagnostica./NL	( ) Normal ( ) Nódulo retrocervical/sigmoide ( ) Outros	
Mirena: ( ) Sim / ( ) Não						
Lesão		Não	Sim	Especificações:	Diâmetro	Lado (Esg/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						
- Adeniose						
- Outros						
Cromotubagem				Positiva à esquerda Positiva à direita	Negativa à esquerda Negativa à direita	
Ressecção de todos fezes visíveis: ( ) sim / ( ) não						
Complicações:						

## Continuação- Relatório Cirúrgico.

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 4	COMPLETA 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 tubáreas estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16.

Endometriose Adicional : \_\_\_\_\_

Patologias Associadas : \_\_\_\_\_



**ANEXO IV- 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 \_\_\_\_\_

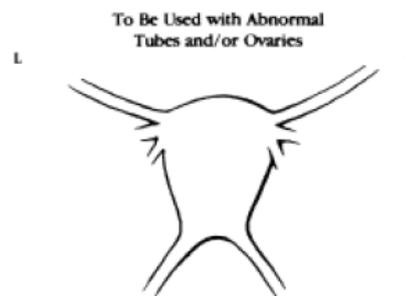
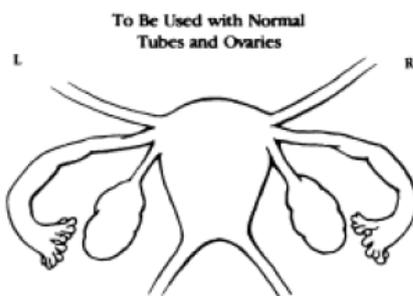
PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	<1cm	1-3cm	>3cm
	Superficial	1	2	4
Deep	2	4	6	
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete	
		4	40	
OVARY	ADHESIONS	<1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	>2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L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

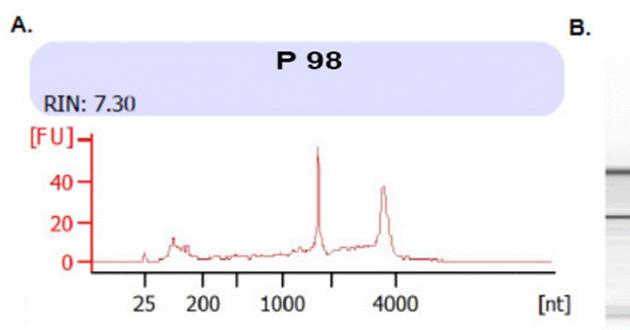
Denote appearance of superficial implant types as red [(R), red, red-pink, flamelike, vesicular blobs, clear vesicles], white [(W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown], or black [(B) black, hemosiderin deposits, blue]. Denote percent of total described as R\_\_\_%, W\_\_\_% and B\_\_\_%.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

Additional Endometriosis: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Associated Pathology: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



## **ANEXO V. Análise da qualidade das amostras de RNA e *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real**



**Figura 1. Representação gráfica da integridade de RNA gerada pelo software do equipamento 2100 *Bioanalyzer*. A.** Gráfico indicativo dos picos 18S e 28S do RNA; **B.** Gel virtual com as beas representativas de 28S e 18S; RIN (*RNA integrity number*); P98: identificação da paciente.

**Tabela 1.** Análise da qualidade e integridade das amostras de RNA de mulheres com endometriose e controles.

ENDOMETRIOSE			CONTROLES		
ID	Endométrio		ID	Endométrio	
EDT	Razão 260/280nm	RIN	CTR	Razão 260/280nm	RIN
P 57	1,9	6,1	C 30	2,0	5,9
P 63	1,9	6,5	C 31	2,0	6,4
P 66	1,9	5,0	C 37	2,0	7,1
P 72	1,9	7,4	C 38	2,0	6,0
P 78	1,9	6,9	C 42	2,0	6,9
P 81	1,9	6,0	C 43	1,8	6,8
P 88	1,9	7,2	C 44	2,0	7,5
P 90	2,0	7,2	C 47	2,0	5,5
P 93	2,0	7,2	C 48	1,8	6,4
P 97	2,0	6,9	C 50	2,0	7,3
P 98	1,9	7,3	C 53	1,9	6,4
P 107	2,0	6,7	C 54	2,0	6,3
P 112	1,5	5,5	C 57	2,0	5,0
P 113	1,7	6,5	C 58	2,0	5,1
P 159	1,5	7,5	C 70	1,9	5,0
P 161	1,9	5,4	C 75	1,7	7,0
P 177	2,0	7,2	C 77	1,8	6,5
P 178	1,8	5,0	C 78	1,6	6,6
P 179	1,8	5,0	C 79	2,0	6,2
P 180	1,7	5,1	C 80	2,0	6,3
P 181	2,0	5,4	C 81	1,7	5,1
P 182	2,0	5,8	C 82	1,8	6,9
P 183	1,8	5,2	C 83	1,9	8,1
P 184	1,8	5,4			

ID: identificação; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; RIN: do inglês, *RNA Integrity number* – valores gerados pelo software do equipamento 2100 *Bioanalyzer*.

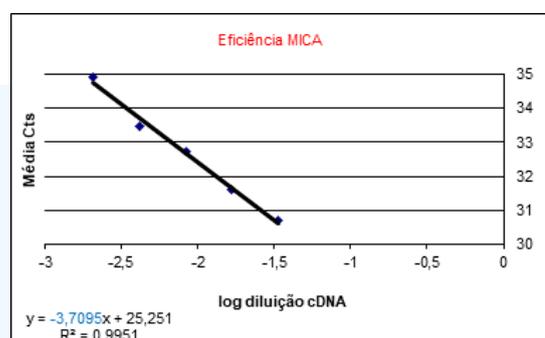
**Tabela 2.** Sequências e características físico-químicas dos pares de primers MICA e  $\beta$ -actina, e produto de amplificação do gene MICA.

Desenhos e características físico-químicas dos primers para mRNA de MICA e $\beta$ -actina						
Gene	Referência		Sequência do primer (5'→3')	tamanho	Tm (°C)	CG (%)
<b>MICA</b>	NM_000247 (Martín-Pagola et al., 2003)	<i>forward</i>	GGATGACCCTGGCTCATATCA	21	58,4	52,4
		<i>reverse</i>	CATGGATCTCACAGACCCTAATCT	24	57,3	45,8
<b><math>\beta</math>-actina</b>	NG_007992.1	<i>forward</i>	GGCACCAGCACAATGAAG	19	59,4	57,9
		<i>reverse</i>	CCGATCCACACGGAGTACTTG	21	60,5	57,1
Produto de amplificação do gene MICA (78bp)						
GGATGACCCTGGCTCATATCAAGGACCAGAAAGAAGGCTTGCAATCCCTCCAGGAGATTAGGGTCTGTGAGATCCATG						

Bp; pares de bases; NG; número 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 *senso* (5'→3') do ácido nucléico; *reverse*: primer iniciador da fita *anti-senso* (3'→5') do ácido nucleico; Tm: do inglês *melting point*; CG: percentual de bases Citosina e Guanina.

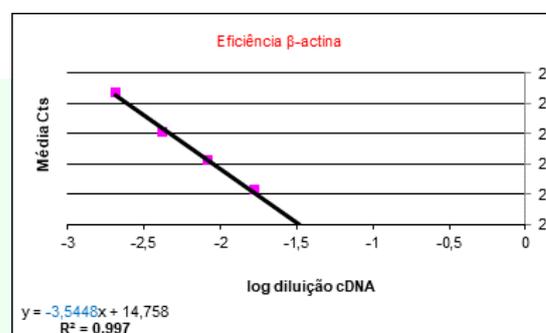
A) *Primer alvo: gene MICA*

MICA	diluição cDNA	diluição cDNA	log da diluição	média Cts	Eficiência
✓	1/30	0,0333333	-1,4771213	30,71	<b>1,86028</b>
✓	1/60	0,0166667	-1,7781513	31,59	
	1/120	0,0083333	-2,0791812	32,72	
	1/240	0,0041667	-2,3802112	33,47	
	1/280	0,0020833	-2,6812482	34,91	



B) *Primer utilizado para o gene normalizador,  $\beta$ -actina*

$\beta$ -ACTINA	diluição cDNA	diluição cDNA	log da diluição	média Cts	Eficiência
✓	1/30	0,0333333	-1,4771213	19,97	<b>1,91471</b>
✓	1/60	0,0166667	-1,7781513	21,14	
	1/120	0,0083333	-2,0791812	22,13	
	1/240	0,0041667	-2,3802112	23,05	
	1/280	0,0020833	-2,6812482	24,35	



**Figura 2.** Representação gráfica do cálculo da eficiência dos primers para os genes MICA e  $\beta$ -actina. A regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição de cDNA forneceu o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ), que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação (Ef) do produto, segundo a fórmula:  $Ef = 10^{-1/a}$  ou  $Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$ .

## **ANEXO VI. Titulação do Ac anti-MICA PE e anti-MICA não marcado, e avaliação da proporção células efectoras: alvo (E:A).**

- **Titulação do Ac anti-MICA PE** (FAB1300, *mouse anti-human IgG<sub>2</sub>, PE-conjugated anti-MICA*, clone 159227; R&D, Minneapolis, EUA): para a titulação foram utilizadas as diluições 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100, realizadas em tampão de lavagem citometria de fluxo ((PBS-1x + 2% Soro Fetal Bovino + 0,02% Azida Sódica). O teste foi realizado com células K562 (linhagem de células de leucemia mieloide crônica humana) e células Hela (câncer cervical humano) (ambas doadas pela Dra. Mari Sogayar, NUCEL, Núcleo de Terapia Celular e Molecular, FMUSP) com 8-10 dias de cultivo celular.  $2 \times 10^5$  células (K562 e Hela) foram ressuspensas em tampão de lavagem e distribuídas em tubos FACs (BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA) e foram incubadas com o Ac nas diluições específicas, por 30min, ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 500µl do tampão de lavagem e os tubos foram centrifugados a 450g, por 5min. Após mais 2 lavagens, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lavagem para aquisição no citômetro de fluxo BD FACs Canto II (BD Bioscience, EUA). A melhor diluição deu-se para a menor diluição que gerou a melhor definição de positividade da molécula MICA na população em estudo, e com menor presença de ligação inespecífica, definida como 1:50.
- **Titulação do Ac anti-MICA não marcado** (MAB1300, *mouse anti-human IgG<sub>2B</sub>*, clone 159227; R&D Systems, USA), utilizado para bloqueio de MICA na superfície celular: para a titulação do foram utilizadas as diluições 1:2, 1:5, 1:10 e o Ac puro. O ensaio foi realizado com  $2 \times 10^5$  células (K562 e Hela) em tampão de lavagem, distribuídas em tubos FACs. Após centrifugação e retirada do sobrenadante, foi adicionado o 1º Ac, anti-MICA não marcado, nas diluições específicas, seguido de incubação, por 30min, ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 500µl de tampão de lavagem e os tubos foram centrifugados a 300g, por 5min. Esta etapa foi realizada por 2 vezes. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado o conjugado (Ac secundário), *rabbit anti-mouse Alexa Fluor 633* (clone A21063, Invitrogen, EUA) na diluição 1:200, seguindo-se com incubação por mais 30min, ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 500µl de tampão de lavagem, seguindo-se com nova lavagem dos tubos (300g, 5min). Após mais 2 lavagens, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lavagem para aquisição no citômetro de fluxo. A melhor diluição deu-se para a menor diluição que gerou a melhor definição de positividade da molécula MICA na população em estudo, e com menor presença de ligação inespecífica, definida como 1:10.
- **Avaliação da proporção células efectoras – alvo (E:A):** a linhagem celular K562 foi mantida por 8 -10 dias em cultura (meio R10) e utilizada como células alvo (A) e as PBMCs isoladas de mulheres CTR e EDT, como células efectoras (E). As PBMCs foram descongeladas

(Métodos, item 3.7), lavadas em meio R10, a 400g, por 8 min. Após avaliação da concentração e viabilidade celular, as PBMCs foram ressuspensas em 4 mL de R10 com 1 $\mu$ g/mL de DNase (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e mantidas em repouso por 16-18, em posição inclinada a 45°, com tampas soltas, em incubadora de CO<sub>2</sub> umidificada, a 37° C.

O ensaio seguiu o protocolo descrito em Métodos, item 3.9.2, para a identificação da expressão de IFN- $\gamma$  e CD107a. Foram avaliadas as proporções E:A: 10:1, 5:1 e 2:1, de forma a padronizar a melhor condição para o ensaio, baseando-se na produção de CD107a e IFN- $\gamma$ . A melhor proporção E:A foi a que gerou a maior expressão de ambas as moléculas em células NK, em ao menos 3 amostras de PBMC de mulheres com endometriose e mulheres controles saudáveis, definida como 1:5.

As aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACs Canto II (BD Bioscience, USA) (Métodos, item 3.9.1).

## **ANEXO VII. Expressão gênica de *MICA***

**Tabela 1.** Valores de Ct e  $\Delta$ Ct referentes à expressão do gene *MICA* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e respectivos dados clínicos.

A) Grupo endometriose

ID	Endométrio			Dados clínicos e cirúrgicos				
	EDT	Ct <i>MICA</i>	Ct $\beta$ -Actina	$\Delta$ Ct	Fase ciclo	Estádio (ASRM)	Localização EDT	Idade
P 57		30,321	21,290	9,031	S	III	PF	26
P 63		29,623	19,028	10,595	S	IV	PF	33
P 66		31,601	18,762	11,407	S	IV	PF	30
P 72		31,598	19,593	12,005	S	IV	PF	33
P 78		31,835	18,417	13,418	S	IV	PF	27
P 81		29,913	18,716	11,196	P	IV	PF	34
P 88		30,331	19,411	10,920	S	IV	PF + OVA	33
P 90		32,429	21,472	10,957	S	IV	PF	29
P 93		29,247	20,553	8,694	P	IV	PF	25
P 97		30,148	20,190	9,958	S	IV	PF	42
P 98		30,276	19,317	10,958	P	IV	PF	26
P 107		32,451	21,318	11,133	S	III	PF + OVA	33
P 112		31,357	21,759	9,598	S	IV	PF	37
P 113		31,381	20,548	10,833	S	IV	PF	38
P 159		33,282	22,012	11,270	S	II	PF	37
P 161		32,436	21,563	10,873	S	IV	PF	38
P 177		30,125	19,715	10,410	P	IV	PF + OVA	40
P 178		33,005	23,340	9,665	NR	IV	PF	37
P 179		31,741	20,564	11,177	S	IV	PF	36
P 180		32,230	21,935	10,295	P	IV	PF + OVA	43
P 181		31,316	19,592	11,724	S	IV	PF	30
P 182		29,335	20,659	8,676	S	IV	PF	35
P 183		29,791	19,705	10,086	P	IV	PF	29
P 184		35,676	22,164	13,511	P	IV	PF	32
<b>Média (DP)</b>		31,310 (1,5)	20,484 (1,3)	10,776 (1,2)				33,5 (4,9)

ID: identificação do paciente; Ct: *Threshold cycle* (média de triplicata);  $\Delta$ Ct= Ct *MICA* - Ct  $\beta$ -actina, EDT: grupo endometriose; P: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia); S: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia); PF: endometriose profunda; PROF+OVA: EDT profunda na presença de EDT ovariana (OVA); NR: não referida; I: estágio inicial, mínimo; II: estágio inicial, leve; estágio avançado, moderado, estágio avançado, grave; estádios de acordo com rASRM.

**Continuação Tabela 1.** Valores de Ct e  $\Delta$ Ct referentes à expressão do gene *MICA* no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e respectivos dados clínicos.

B) Grupo controle

ID	Endométrio			Dados clínicos		
	Controle	Ct <sub>MICA</sub>	Ct <sub><math>\beta</math>-Actina</sub>	$\Delta$ Ct	Fase do ciclo	Idade
C 30		31,819	21,423	10,40	P	32
C 31		31,478	19,900	11,58	S	36
C 37		30,925	20,185	10,74	S	34
C 38		31,513	20,935	10,58	P	31
C 42		30,350	20,017	10,33	P	35
C 43		31,540	19,775	11,77	P	30
C 44		31,608	21,351	10,26	P	29
C 47		30,909	20,323	10,59	P	26
C 48		30,662	20,450	10,21	P	35
C 50		30,791	19,743	11,05	P	30
C 53		34,064	25,161	8,90	P	36
C 54		31,443	21,562	9,88	S	29
C 57		30,488	22,271	8,22	S	29
C 58		31,661	23,744	7,92	NR	35
C 70		32,748	22,309	10,44	P	36
C 75		30,251	19,891	10,36	S	40
C 77		30,261	20,525	9,74	NR	37
C 78		31,379	21,098	10,28	S	43
C 79		33,714	22,484	11,23	P	25
C 80		34,064	22,143	11,92	P	30
C 81		32,042	20,850	11,19	P	39
C 82		33,960	21,716	12,24	NR	32
C 83		33,879	22,712	10,36	S	32
<b>Média (DP)</b>		31, 807 (1,3)	21,329 (1,3)	10,44 (1,0)		33,1 (4,4)

ID: identificação do paciente; Ct: *Threshold cycle* (média de triplicata);  $\Delta$ Ct= Ct *MICA* - Ct  *$\beta$ -actina* (gene normalizador); P: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia); S: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia); NR: não referida;

## **ANEXO VIII. Expressão proteica de MICA**

**Tabela 1.** Escores individualizados de frequência e intensidade de expressão da proteína MICA em epitélio glandular e estroma, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e controles, e na lesão de mulheres com endometriose, e dados clínicos.

A) Grupo endometriose: escores da lesão e do endométrio eutópico e dados clínicos.

ID	Tecido	Epitélio glandular - escore			Estroma - escore			dados clínicos		
		Frequencia	Intensidade	EIR glândula	Frequencia	Intensidade	EIR estroma	Fase ciclo	Estádio ARSM	Idade
P 78	lesão RS	3	2	6	1	2	2	S	IV	27
	endométrio	3	2	6	1	2	2			
P 79	lesão RS	3	1	3	1	1	1	S	IV	30
	endométrio	3	1	3	1	1	1			
P 86	lesão RC	0	0	0	0	0	0	P	II	41
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 96	lesão RS	1	1	1	0	0	0	S	IV	32
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 97	lesão RS	2	1	2	2	1	2	S	IV	42
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 99	lesão RC	1	1	1	0	0	0	S	II	35
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 100	lesão RS	1	1	1	1	1	1	P	I	39
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 103	lesão RC	2	1	2	0	0	0	P	I	44
	endométrio	4	1	4	2	1	2			
P 104	lesão RC	3	2	6	0	0	0	P	II	34
	endométrio	4	3	12	0	0	0			
P 105	lesão RC	4	1	4	0	0	0	S	III	44
	endométrio	4	2	8	2	1	2			
P 108	lesão RC	3	2	6	1	1	1	S	II	35
	endométrio	3	2	6	1	1	1			
P 110	lesão RC	2	1	2	1	1	1	S	III	25
	endométrio	4	3	12	2	1	2			
P 118	lesão RC	3	1	3	1	1	1	S	II	26
	endométrio	4	3	12	2	1	2			
P 119	lesão RC	3	2	6	2	1	2	P	II	42
	endométrio	2	1	2	1	1	1			
P 121	lesão RC	3	2	6	3	1	3	P	III	34
	endométrio	3	2	6	3	1	3			
P 124	lesão RC	4	2	8	3	1	3	P	II	27
	endométrio	2	1	2	3	1	3			
P 126	lesão RS	1	1	1	0	0	0	P	II	38
	endométrio	3	1	3	0	0	0			
P 128	lesão RS	4	2	8	3	1	3	P	II	34
	endométrio	2	1	2	0	0	0			
P 139	lesão RS	0	0	0	0	0	0	S	IV	33
	endométrio	0	0	0	0	0	0			
P 143	lesão RC	1	1	1	0	0	0	P	III	46
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 144	lesão RS	3	1	3	0	0	0	S	II	37
	endométrio	3	2	6	0	0	0			
P 147	lesão RS	1	1	1	0	0	0	S	IV	21
	endométrio	2	1	2	1	1	1			
P 149	lesão RC	1	1	1	0	0	0	S	IV	32
	endométrio	3	2	6	0	0	0			
P 158	lesão RS	2	1	2	0	0	0	P	IV	39
	endométrio	4	3	12	0	0	0			
P 185	lesão RS	1	1	1	1	1	1	P	II	40
	endométrio	1	1	1	1	1	1			
P 186	lesão RS	1	1	1	1	1	1	S	IV	35
	endométrio	3	1	3	1	1	1			
P 187	lesão RC	3	2	6	1	1	1	S	III	30
	endométrio	2	1	2	1	1	1			
P 188	lesão RC	1	1	1	0	0	0	S	IV	35
	endométrio	1	1	1	0	0	0			
P 189	lesão RS	4	1	4	0	0	0	P	IV	38
	endométrio	4	2	8	0	0	0			

ID: identificação do paciente; P: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia); S: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia); I: estágio inicial, mínimo; II: estágio inicial, leve; estágio avançado, moderado, estágio avançado, grave; estádios de acordo com a rASRM; EIR: escore de imunorreatividade (definido pelo escore de intensidade de expressão de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão de MICA).

**Continuação Tabela 1.** Escores individualizados de frequência e intensidade de expressão da proteína MICA em epitélio glandular e estroma, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e na lesão de mulheres com endometriose, e dados clínicos.

B) Grupo controle: escores no endométrio e dados clínicos

ID	Tecido	Epitélio glandular - escore			Estroma - escore			Dados clínicos	
		Frequencia	Intensidade	EIR glândula	Frequencia	Intensidade	EIR estroma	Fase ciclo	Idade
C 43	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	30
C 44	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	29
C 45	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	25
C 47	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	26
C 48	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	35
C 51	endométrio	2	1	2	2	1	2	S	25
C 57	endométrio	1	1	1	1	1	1	S	29
C 58	endométrio	2	1	2	2	1	2	P	35
C 60	endométrio	2	1	2	2	1	2	P	34
C 61	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	32
C 63	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	36
C 64	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	33
C 68	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	26
C 70	endométrio	4	1	4	0	0	0	P	36
C 71	endométrio	4	2	8	0	0	0	S	34
C 73	endométrio	4	2	8	0	0	0	S	37
C 75	endométrio	4	2	8	0	0	0	S	40
C 79	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	25
C 80	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	30
C 83	endométrio	4	1	4	0	0	0	S	32
C 84	endométrio	2	1	2	1	1	1	P	38
C 85	endométrio	1	1	1	1	1	1	P	46
C 86	endométrio	4	1	4	0	0	0	S	36

ID: identificação do paciente; P: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia); S: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia); EIR: escore de imunorreatividade (definido pelo escore de intensidade de expressão de MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão de MICA).

**Tabela 2.** Estatística descritiva de EIR para MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e na lesão de mulheres com endometriose (A), EIR de acordo fase do ciclo menstrual (B), estádios da endometriose (C) e localização da lesão profunda de endometriose (D).

A) Estatística descritiva de EIRs em epitélio glandular e estroma.

	média (DP)	mediana (min-max)	<i>p</i>
<b>EIR glândula (epitélio)</b>			
lesão (n=29)	3 (2,4)	2 (0-8)	0,1270
endométrio EDT (n=29)	4,7 (3,8)	3 (0-12)	
endométrio CTR (n=23)	2,7 (2,3)	2 (1-8)	
<b>EIR estroma</b>			
lesão (n=29)	0,8 (1,0)	0 (0-3)	0,5623
endométrio EDT (n=29)	0,8 (1,0)	0 (0-3)	
endométrio CTR (n=23)	0,9 (0,6)	1 (0-2)	

EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão de MICA; endométrio: endométrio eutópico; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; DP; desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max; valor máximo da mediana; valores de *p* determinados pelo teste de *Kruskal-Wallis*

B) Estatística descritiva do EIR em epitélio glandular e estroma, de acordo com a fase do ciclo menstrual.

Expressão de MICA	Fase do ciclo	média (DP)	mediana (min-max)	<i>p</i>
<b>EIR glândula (epitélio)</b>				
lesão (n=29)	P	3,5 (2,9)	2,0 (0-8)	0,4698
	S	2,6 (2,0)	2,0 (0-6)	
endométrio eutópico EDT (n=29)	P	4,2 (4,0)	2,0 (1-12)	0,4627
	S	5,0 (3,8)	4,5 (0-12)	
endométrio eutópico CTR (n=23)	P	1,7 (0,8)	2,0 (1-4)	<b>0,0043</b>
	S	5,0 (3,0)	4,0 (1-8)	
<b>EIR estroma</b>				
lesão (n=29)	P	1,0 (1,3)	0,0 (0-3)	0,6871
	S	0,6 (0,7)	0,5 (0-2)	
endométrio eutópico EDT (n=29)	P	0,8 (1,2)	0,0 (0-3)	0,6185
	S	0,8 (0,8)	1,0 (0-2)	
endométrio eutópico CTR (n=23)	P	1,1 (0,4)	1,0 (0-2)	<b>0,0074</b>
	S	0,4 (0,8)	0,0 (0-2)	

EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; DP; desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; P: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup>– 14<sup>o</sup> dia); S: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> – 30<sup>o</sup>); análise realizada por imunohistoquímica; em negrito: valores significantes (<0,05); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Continuação Tabela 2.** Estatística descritiva do EIR para MICA no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e de controles, e na lesão de mulheres com endometriose (A), EIR de acordo fase do ciclo menstrual (B), estádios da endometriose (C) e localização da lesão profunda de endometriose (D).

C) Estatística descritiva do EIR em epitélio glandular e estroma, de acordo com o estágio da endometriose.

Expressão MICA	média (DP)	mediana (min-max)	$p^a$	$p^b$
<b>EIR glândula (epitélio)</b>			0,3464	
<b>estádios I / II (n=13)</b>				
lesão	3,2 (2,9)	3,0 (0-8)		
endométrio eutópico	4,2 (4,0)	2,0 (1-12)		0,5060
<b>estádios III / IV (n=16)</b>				
lesão	2,5 (2,1)	2,0 (0-6)		
endométrio eutópico	4,8 (3,9)	3,5 (0-12)		0,0949
<b>EIR estroma</b>			0,9294	
<b>estádios I / II (n=13)</b>				
lesão	0,9 (1,1)	1,0 (0-3)		
endométrio eutópico	0,7 (0,9)	0,0 (0-3)		0,6896
<b>estádios III / IV (n=16)</b>				
lesão	0,7 (0,9)	0,0 (0-3)		
endométrio eutópico	0,8 (1,0)	0,5 (0-3)		0,7548

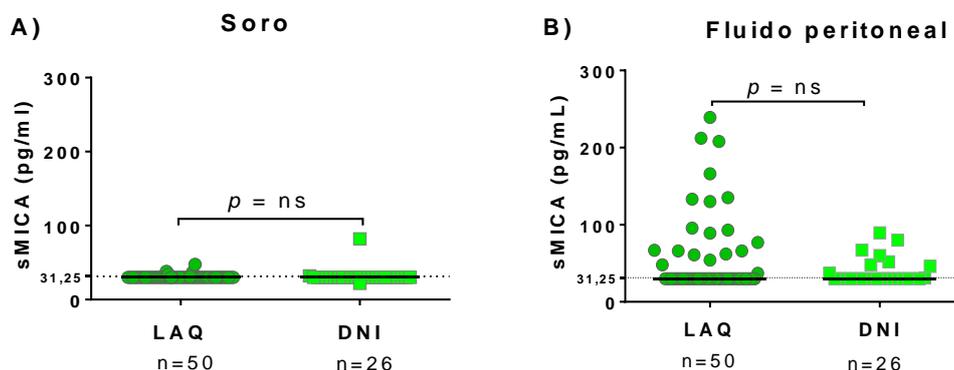
EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; I/II; estágio iniciais da endometriose; III/IV; estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM;  $p^a$ : valores de  $p$  determinados pelo teste de Kruskal-Wallis na comparação entre os estádios e tecidos de lesão e endométrio eutópico;  $p^b$ : valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney* na comparação entre a lesão e endométrio eutópico.

D) Estatística descritiva do EIR em epitélio glandular e estroma, de acordo com a localização da lesão profunda de endometriose.

Expressão MICA	média (DP)	mediana (min-max)	$p$
<b>EIR glândula (epitélio)</b>			
<b>retossigmóide (n=14)</b>	2,4 (2,2)	1,5 (0-8)	
<b>retocervical (n=15)</b>	3,5 (2,6)	3,0 (0-8)	0,2760
<b>EIR estroma</b>			
<b>retossigmóide (n=14)</b>	0,8 (1,0)	0,5 (0-3)	
<b>retocervical (n=15)</b>	0,8 (1,1)	0,0 (0-3)	0,9578

EIR: escore de imunorreatividade, definido pelo escore intensidade de expressão MICA multiplicado pelo escore de frequência de expressão MICA; DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney* na comparação entre as lesões de retossigmóide e retocervical.

## ANEXO IX. MICA SOLÚVEL (sMICA)



**Figura 1.** Distribuição da concentração de sMICA (pg/mL) em mulheres do grupo controle provenientes de laqueadura tubária (LAQ) e doenças não inflamatórias (DNI). (A) níveis de sMICA no soro; (B) níveis de sMICA no fluido peritoneal; níveis de sMICA determinados por ELISA; a linha tracejada representa o limite inferior de detecção do teste (31,25 pg/mL); ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ), sMICA: MICA solúvel; as barras horizontais representam a mediana; valores de  $p$  determinados pelo Teste *Mann-Whitney*.

**Tabela 1.** Níveis de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal de mulheres com endometriose de acordo com estágio da doença e controles.

		sMICA (pg/mL)		
	n	Média ( $\pm$ DP)	Mediana (min-max)	$p$
<b><u>Soro</u></b>				
CTR	76	<31,25 ( $\pm$ 6,3)	<31,25 (<31,25-82)	
I	24	31,63 ( $\pm$ 5,8)	<31,25 (<31,25-56)	
II	39	40,24 ( $\pm$ 23,6)	<31,25 (<31,25-148)	<b>0,0004</b>
III	34	44,24 ( $\pm$ 30,9)	<31,25 (<31,25-145)	
IV	63	42,34 ( $\pm$ 23,8)	<31,25 (<31,25-155)	
<b><u>FP</u></b>				
CTR	76	52,50 ( $\pm$ 44,8)	<31,25 (<31,25–239,0)	
I	24	55,92 ( $\pm$ 44,8)	<31,25 (<31,25–222)	
II	39	132,00 ( $\pm$ 176,4)	64,5 (<31,25-893)	<b>&lt;0,0001</b>
III	34	102,60 ( $\pm$ 128,4)	57,5 (<31,25-694)	
IV	63	138,60 ( $\pm$ 166,6)	80,0 (<31,25-695)	

I: endometriose inicial mínima; II, endometriose inicial leve; III: endometriose avançada moderada; IV: endometriose avançada grave; estádios de acordo com a rASRM; FP: fluido peritoneal; DP: desvio padrão; CTR: grupo controle; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; < 31,25pg/mL: valores abaixo do limite de detecção do teste (31,25pg/mL); sMICA: MICA solúvel; níveis de sMICA determinados por ELISA; em negrito: valores de  $p$  significantes ( $<0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste *Kruskal-Wallis*.

**Tabela 2.** Concentrações de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal e dados clínicos e demográficos das mulheres com endometriose e de controles.

A) Grupo endometriose

Id	sMICA(pg/mL)		Fase ciclo	Estádio (ASRM)	Tipo de lesão	Idade	Id	sMICA(pg/mL)		Fase ciclo	Estádio (ASRM)	Tipo de lesão	Idade
	soro	FP						soro	FP				
P 01	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	36	P 82	<31,25	86	Secretora	I	SUP	36
P 02	<31,25	258	Secretora	II	PF + OVA	47	P 83	<31,25	694	Secretora	III	PF + OVA	28
P 03	<31,25	399	Secretora	IV	OVA	45	P 84	44	74	Secretora	II	PF	41
P 04	<31,25	376	Proliferativa	III	PF + OVA	27	P 85	53	164	Secretora	IV	PF + OVA	39
P 05	148	297	Secretora	II	PF	30	P 86	<31,25	<31,25	Proliferativa	II	PF	41
P 06	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	45	P 87	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	37
P 07	70	72	Proliferativa	II	PF	50	P 88	<31,25	80	Secretora	IV	PF + OVA	33
P 08	<31,25	<31,25	Proliferativa	III	PF	28	P 89	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF + OVA	49
P 09	32	43	Proliferativa	IV	PF + OVA	44	P 90	<31,25	507	Secretora	IV	PF	29
P 10	42	417	Proliferativa	II	PF	30	P 91	<31,25	240	Secretora	II	PF	36
P 11	<31,25	85	Secretora	III	PF	37	P 92	<31,25	89	Proliferativa	I	PF	39
P 12	86	158	Secretora	II	PF	39	P 93	<31,25	69	Proliferativa	IV	PF	25
P 13	121	139	Secretora	III	PF + OVA	29	P 94	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	30
P 14	<31,25	120	Secretora	IV	PF + OVA	33	P 95	<31,25	115	Secretora	III	PF + OVA	33
P 15	64	228	Proliferativa	IV	PF	35	P 96	<31,25	131	Secretora	IV	PF + OVA	32
P 16	<31,25	61	Secretora	II	PF	29	P 97	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	42
P 17	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	32	P 98	35,7	338	Proliferativa	IV	PF	26
P 18	64	129	Secretora	IV	PF + OVA	30	P 99	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	35
P 19	74	893	Proliferativa	II	PF	35	P 100	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	39
P 20	<31,25	43	Secretora	IV	PF + OVA	26	P 101	<31,25	<31,25	Secretora	I	SUP	29
P 21	145	147	Proliferativa	III	OVA	35	P 102	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	39
P 22	<31,25	56	Secretora	III	PF	35	P 103	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	44
P 23	<31,25	<31,25	Secretora	I	PF	34	P 104	<31,25	<31,25	Proliferativa	II	PF	35
P 24	91	87	Secretora	IV	PF + OVA	32	P 105	<31,25	59	Secretora	III	PF	44
P 25	<31,25	54	Proliferativa	IV	PF + OVA	33	P 106	<31,25	<31,25	Secretora	III	PF	26
P 26	59	138	Proliferativa	IV	PF + OVA	29	P 107	<31,25	<31,25	Secretora	III	PF + OVA	33
P 27	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF	35	P 108	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	35
P 28	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF + OVA	33	P 109	<31,25	<31,25	Secretora	III	PF	32
P 29	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF + OVA	38	P 110	<31,25	<31,25	Secretora	III	PF + OVA	25
P 30	81	193	Proliferativa	III	PF + OVA	31	P 111	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	30
P 31	108	43	Secretora	III	OVA	34	P 112	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	37
P 32	<31,25	67	Proliferativa	II	PF	30	P 113	72	148	Secretora	IV	PF	38
P 33	<31,25	52	Proliferativa	I	PF	34	P 114	<31,25	131	Secretora	IV	PF	31
P 34	37	304	Secretora	IV	PF + OVA	38	P 115	<31,25	189	Proliferativa	II	PF	32
P 35	43	57	Secretora	I	PF	45	P 116	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	28
P 36	155	124	Secretora	IV	PF	38	P 117	<31,25	87	Secretora	I	PF	43
P 37	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF + OVA	32	P 118	85	414	Secretora	II	PF	26
P 38	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	SUP	43	P 119	<31,25	62	Proliferativa	II	PF	42
P 39	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	31	P 120	<31,25	<31,25	Secretora	III	OVA	37
P 40	83	47	Secretora	IV	PF + OVA	47	P 121	<31,25	32	Secretora	III	PF	34
P 41	60	695	Secretora	IV	OVA	36	P 122	<31,25	295	Secretora	II	PF	35
P 42	<31,25	145	Secretora	III	OVA	29	P 123	56	222	Proliferativa	I	SUP	27
P 43	<31,25	<31,25	Proliferativa	III	PF + OVA	35	P 124	<31,25	<31,25	Proliferativa	II	PF	27
P 44	42	<31,25	Proliferativa	III	PF + OVA	35	P 125	<31,25	46	Proliferativa	IV	PF	45
P 45	33	74	Proliferativa	II	PF	32	P 126	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	38
P 46	47	139	Secretora	IV	PF + OVA	29	P 127	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	43
P 47	47	235	Secretora	IV	PF	49	P 128	<31,25	55	Proliferativa	II	PF	34
P 48	<31,25	<31,25	Secretora	III	PF + OVA	32	P 129	<31,25	<31,25	Secretora	I	SUP	43
P 49	<31,25	72	Proliferativa	III	PF	31	P 130	<31,25	<31,25	Secretora	III	OVA	36
P 50	123	510	Proliferativa	IV	OVA	31	P 131	40	44	Secretora	II	PF	38
P 51	<31,25	<31,25	Secretora	III	OVA	21	P 132	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF	43
P 52	35	60	Secretora	II	PF	32	P 133	<31,25	<31,25	Proliferativa	III	OVA	40
P 53	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF + OVA	31	P 134	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	40
P 54	71	129	Secretora	IV	PF + OVA	34	P 135	<31,25	101	Proliferativa	III	PF + OVA	32
P 55	<31,25	114	Secretora	IV	PF + OVA	31	P 136	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	42
P 56	<31,25	112	Secretora	I	PF	36	P 137	36	66	Secretora	III	PF + OVA	48
P 57	67	143	Secretora	III	PF	26	P 138	44	172	Secretora	III	PF	38
P 58	34	87	Secretora	II	PF	34	P 139	<31,25	198	Secretora	IV	PF	33
P 59	<31,25	174	Proliferativa	IV	PF + OVA	38	P 140	<31,25	92	Secretora	I	SUP	50
P 60	<31,25	87	Proliferativa	III	PF	38	P 141	<31,25	67	Proliferativa	II	PF	32
P 61	<31,25	184	Secretora	III	PF	47	P 142	<31,25	<31,25	Secretora	I	SUP	35
P 62	<31,25	58	Secretora	IV	OVA	34	P 143	<31,25	<31,25	Proliferativa	III	PF	46
P 63	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	33	P 144	35,5	79	Secretora	II	PF	20
P 64	71	444	Secretora	IV	PF	35	P 145	<31,25	547	Secretora	II	PF	28
P 65	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	PF	44	P 146	<31,25	175	Secretora	IV	PF	25
P 66	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	30	P 147	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF + OVA	21
P 67	<31,25	33	Proliferativa	I	SUP	30	P 148	<31,25	<31,25	Proliferativa	II	PF	22
P 68	110	162	Secretora	III	PF + OVA	35	P 149	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	21
P 69	<31,25	334	Proliferativa	IV	PF	32	P 150	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	37
P 70	<31,25	<31,25	Proliferativa	III	PF	38	P 151	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	SUP	28
P 71	<31,25	92	Secretora	I	SUP	31	P 152	<31,25	<31,25	Proliferativa	IV	PF	41
P 72	<31,25	88	Secretora	IV	PF	33	P 153	<31,25	<31,25	Secretora	II	SUP	35
P 73	<31,25	109	Secretora	II	PF	28	P 154	59,5	353	Proliferativa	IV	PF	38
P 74	<31,25	47	Secretora	IV	PF + OVA	37	P 155	62,7	220	Proliferativa	II	SUP	42
P 75	59	554	Proliferativa	IV	PF + OVA	37	P 156	<31,25	<31,25	Proliferativa	II	PF	37
P 76	63	129	Proliferativa	IV	PF	45	P 157	<31,25	<31,25	Secretora	II	PF	35
P 77	<31,25	<31,25	Proliferativa	I	SUP	30	P 158	<31,25	80	Proliferativa	IV	PF	37
P 78	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	27	P 159	<31,25	32	Secretora	II	PF	38
P 79	37	85	Secretora	IV	PF	30	P 160	<31,25	<31,25	Secretora	IV	PF	33
P 80	<31,25	129	Secretora	II	PF	36	P 161	54,2	573	Secretora	IV	PF	38
P 81	<31,25	72	Proliferativa	IV	PF	34							

Id, identificação do paciente; FP, fluido peritoneal; ASRM, *American Society for Reproductive Medicine*; I: endometriose inicial mínima; II, endometriose inicial leve; III: endometriose avançada moderada; IV: endometriose avançada grave; estádios de acordo com a ASRM; SUP: EDT superficial, OVA: EDT ovariana, PROF: EDT profunda, PROF+OVA: EDT profunda na presença de EDT ovariana; sMICA: MICA solúvel; níveis de sMICA determinados por ELISA, <31,25 pg/mL: abaixo do limite inferior de detecção do teste.

**Continuação Tabela 2.** Concentrações de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal e dados clínicos e demográficos das mulheres com endometriose e de controles.

B) Grupo controle

Id	sMICA(pg/mL)		Fase ciclo	Idade	Id	sMICA(pg/mL)		Fase ciclo	Idade
	soro	FP				soro	FP		
C 01	<31,25	<31,25	Secretora	52	C 39	<31,25	<31,25	Secretora	34
C 02	<31,25	<31,25	NR	31	C 40	<31,25	<31,25	Proliferativa	39
C 03	<31,25	52	NR	39	C 41	<31,25	<31,25	Secretora	29
C 04	<31,25	<31,25	Proliferativa	47	C 42	<31,25	<31,25	Proliferativa	35
C 05	<31,25	<31,25	NR	44	C 43	<31,25	<31,25	Proliferativa	30
C 06	<31,25	<31,25	Secretora	37	C 44	<31,25	<31,25	Proliferativa	29
C 07	<31,25	46	NR	42	C 45	<31,25	133	Proliferativa	25
C 08	<31,25	<31,25	NR	53	C 46	<31,25	66	Proliferativa	32
C 09	<31,25	<31,25	Secretora	34	C 47	<31,25	37	Proliferativa	26
C 10	<31,25	<31,25	NR	24	C 48	<31,25	62	Proliferativa	35
C 11	<31,25	<31,25	Secretora	21	C 49	<31,25	<31,25	Proliferativa	32
C 12	82	80	NR	45	C 50	<31,25	135	Proliferativa	30
C 13	<31,25	<31,25	Secretora	50	C 51	<31,25	<31,25	Secretora	25
C 14	<31,25	60	NR	31	C 52	<31,25	<31,25	Proliferativa	33
C 15	<31,25	<31,25	Secretora	44	C 53	<31,25	<31,25	Proliferativa	31
C 16	<31,25	<31,25	Proliferativa	46	C 54	<31,25	89	Secretora	29
C 17	<31,25	<31,25	Proliferativa	30	C 55	<31,25	<31,25	Proliferativa	33
C 18	<31,25	<31,25	NR	50,5	C 56	<31,25	<31,25	Secretora	41
C 19	<31,25	67	NR	37	C 57	<31,25	77	Secretora	29
C 20	<31,25	37	Proliferativa	47	C 58	<31,25	<31,25	Proliferativa	35
C 21	<31,25	<31,25	Proliferativa	38	C 59	<31,25	<31,25	Proliferativa	37
C 22	<31,25	<31,25	Secretora	26	C 60	<31,25	<31,25	Proliferativa	34
C 23	<31,25	48	Proliferativa	40	C 61	<31,25	<31,25	Proliferativa	32
C 24	<31,25	<31,25	Proliferativa	30	C 62	<31,25	<31,25	Proliferativa	38
C 25	<31,25	<31,25	Secretora	42	C 63	<31,25	<31,25	Proliferativa	36
C 26	<31,25	89,4	Proliferativa	44	C 64	<31,25	<31,25	Proliferativa	33
C 27	<31,25	<31,25	Secretora	30	C 65	<31,25	48	Proliferativa	40
C 28	<31,25	<31,25	Secretora	33	C 66	<31,25	61	Secretora	38
C 29	<31,25	66	Secretora	29	C 67	<31,25	93	Secretora	32
C 30	<31,25	208	Proliferativa	32	C 68	<31,25	130	Proliferativa	26
C 31	<31,25	<31,25	Secretora	36	C 69	<31,25	<31,25	Secretora	39
C 32	<31,25	<31,25	Proliferativa	28	C 70	<31,25	<31,25	Proliferativa	36
C 33	37	54	Secretora	34	C 71	32	212	Proliferativa	34
C 34	<31,25	<31,25	Secretora	33	C 72	33,9	<31,25	Secretora	39
C 35	38	166	Secretora	31	C 73	47,5	66,8	Secretora	38
C 36	<31,25	<31,25	Secretora	33	C 74	<31,25	95,5	Proliferativa	40
C 37	<31,25	<31,25	Secretora	34	C 75	<31,25	<31,25	Secretora	40
C 38	<31,25	239	Proliferativa	35	C 76	<31,25	<31,25	Proliferativa	40

Id: identificação do paciente; FP: fluido peritoneal; endometriose, sMICA: MICA solúvel; níveis de sMICA determinados por ELISA (pg/mL); <31,25 pg/mL: abaixo do limite inferior de detecção do teste.

**Tabela 3.** Concentrações de MICA solúvel no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose e controles, em relação às fases do ciclo menstrual, estágio da doença e localização das lesões de endometriose.

A) Níveis de sMICA (pg/mL) nos grupos endometriose e controle, de acordo com a fase do ciclo menstrual.

	Fase do ciclo	sMICA - Endometriose				sMICA- Controles				
		n	média (DP)	mediana (min-max)	$p^a$	n	média (DP)	mediana (min-max)	$p^a$	$p^b$
SORO	Proliferativa	62	39,5 (21,9)	<31,25 (<31,25-145)	0,7472	37	<31,25 (0,3)	<31,25 (<31,25-32)	0,0389	0,0012
	Secretora	99	41,2 (25,9)	53 (<31,25-893)		29	<31,25 (3,7)	<31,25 (<31,25-47,5)		0,1056
FLUIDO PERITONEAL	Proliferativa	62	119,7 (160,0)	<31,25 (<31,25-155)	0,4053	37	60,3 (57,0)	<31,25 (<31,25-239)	0,4544	0,0278
	Secretora	99	121 (143,2)	66 (<31,25-695)		29	45,0 (30,4)	<31,25 (<31,25-166)		0,0003

sMICA: MICA solúvel; DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; Fase proliferativa: 1<sup>o</sup>-14<sup>o</sup> dia do ciclo menstrual; Fase secretora: 15<sup>o</sup>- 28<sup>o</sup> dia do ciclo menstrual;  $p^a$ : referem-se às comparações entre a fase proliferativa e secretora, no soro e fluido peritoneal, nos grupos endometriose e controles (teste de Mann-Whitney);  $p^b$ : refere às comparações entre os grupos endometriose e controles em cada fase do ciclo, no soro e fluido peritoneal (teste de Mann-Whitney); em negrito: valores de  $p$  significantes (<0,05); n: número de amostras analisadas em cada grupo (a somatória dos valores de  $n$  no grupo controle é inferior ao  $n$  Total ( $n=76$ ), pois foram excluídos da análise estatística as pacientes cuja fase do ciclo é desconhecida ( $n=10$ ); níveis de sMICA determinados por ELISA.

B) Níveis de sMICA (pg/mL) no grupo endometriose de acordo com os estádios iniciais e avançados e tipos da doença.

	sMICA - Soro				sMICA - Fluido peritoneal			
	n	Média (DP)	Mediana (min-máx)	$p$	Média (DP)	Mediana (min-máx)	$p$	$p^e$
Estádios I/II	63	36,9 (19,1)	<31,25 (<31,25-148)	0,1771 <sup>a</sup>	105,6 (146,6)	53,5 (<31,25-893)	0,1127 <sup>b</sup>	< 0,0001
Estádios III/IV	97	43,0 (26,3)	<31,25 (<31,25-155)		130,3 (151,1)	72,0 (<31,25-695)		< 0,0001
SUP	13	34,5 (11,1)	<31,25 (<31,25-62,7)	0,1654 <sup>c</sup>	73,5 (70,26)	<31,25 (<31,25-222)	0,3320 <sup>d</sup>	0,0547
OVA	11	58,7 (44,47)	<31,25 (<31,25-145)		192,5 (233,7)	58,0 (<31,25-695)		0,1273
PROF	99	37,97 (20,9)	<31,25 (<31,25-155)		115,1 (146,6)	59,0 (<31,25-893)		< 0,0001
PROF + OVA	38	44,11 (24,29)	<31,25 (<31,25-121)		129,8 (144,1)	94,0 (<31,25-694)		< 0,0001

sMICA: MICA solúvel; DP: desvio padrão; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; SUP: endometriose superficial de peritônio; OVA: OVA, endometriose ovariana com ou sem doença peritoneal e sem endometriose profunda; PROF: endometriose profunda com ou sem doença peritoneal e sem ovariana; OVA + PROF: PROF na presença de OVA; estádios I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; em negrito: valores de  $p$  significantes (<0,05); níveis de sMICA determinados por ELISA.

<sup>a</sup> valor de  $p$ : estádios I/II vs III/IV, no soro, teste de Mann-Whitney;

<sup>b</sup> valor de  $p$ : estádios I/II vs III/IV, no fluido peritoneal, teste de Mann-Whitney;

<sup>c</sup> valor de  $p$  referente à comparação entre os tipos de endometriose, no soro, teste de Kruskal-Wallis;

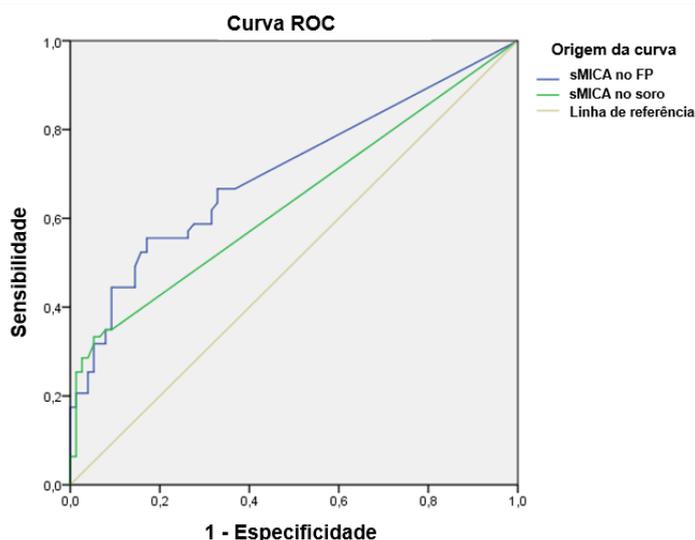
<sup>d</sup> valor de  $p$  referente à comparação entre os tipos de endometriose, no Fluido peritoneal, teste de Kruskal-Wallis;

<sup>e</sup> valores de  $p$  referentes à comparação entre grupo endometriose e grupo controles, em estádios e tipos de endometriose, teste de Mann-Whitney.

**Tabela 4.** Pontos de cortes estabelecidos para níveis de sMICA no soro e fluido peritoneal, e possíveis medidas diagnósticas.

Variável	Ponto de corte sMICA (pg/mL)	AUC (IC 95%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
<b>EDT total</b>				
soro	33,5	0,604 (0,59-0,73)	27	93
FP	32,0	0,660 (0,53-0,68)	60	64
<b>EDT I/II</b>				
soro	33,5	0,578 (0,48-0,68)	23	97
FP	40,5	0,619 (0,52-0,71)	52	67
<b>EDT III/IV</b>				
soro	34,8	0,623 (0,54-0,71)	31	95
FP	44,5	0,684 (0,61-0,76)	60	67
<b>EDT I</b>				
soro	45,3	0,498 (0,36-0,63)	4	97
FP	50,0	0,531 (0,53-0,68)	38	29
<b>EDT II</b>				
soro	37,5	0,627 (0,51-0,74)	23	96
FP	40,5	0,674 (0,57-0,78)	62	67
<b>EDT III</b>				
soro	40,0	0,595 (0,47-0,72)	24	97
FP	55,0	0,646 (0,53-0,76)	53	74
<b>EDT IV</b>				
soro	34,8	0,638 (0,54-0,73)	33	95
FP	40,0	<b>0,704 (0,61-0,79)</b>	67	67

AUC: área sob a curva; EDT: grupo endometriose; EDT total: todos os sujeitos de pesquisa estudados; EDT I/II: estádios iniciais; EDT III/IV: estádios avançados de EDT; estádios de acordo com rASRM; n: número de amostras analisadas em cada grupo; FP: fluido peritoneal; IC: intervalo de confiança; em negrito: valor da AUC considerada discriminatória.



**Figura 2.** Curva ROC para níveis de sMICA no soro e no fluido peritoneal entre mulheres com endometriose estágio IV e controles saudáveis. sMICA: MICA solúvel; FP: fluido peritoneal; Estádio IV: estágio avançado (grave) da endometriose, de acordo com rASRM; ROC: do inglês, *Receiver Operating Curve*; sMICA no soro: valor de corte= 34,8pg/mL, sensibilidade= 33% e especificidade= 95% (5% de falsos positivos), AUC: 0,638 (IC 95: 0,54-0,73); sMICA no FP: valor de corte= 40pg/mL, sensibilidade= 67% e especificidade= 67% (33% de falsos positivos), AUC= 0,704 (IC95%: 0,61-0,79); a sensibilidade indica a probabilidade de um caso de endometriose ser corretamente diagnosticado (verdadeiro positivo) e a especificidade, indica os verdadeiros negativos.

## **ANEXO X. ATIVIDADE EFETORA DE CÉLULAS NK**

**Tabela 1.** Frequência de células K562 com expressão de MICA e sua intensidade de fluorescência, com e sem bloqueio para MICA, e a análise da efetividade do bloqueio, de células utilizadas nos ensaios de moléculas relacionadas à atividade efetora de células NK (CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10).

Experimento	K562			K562BLOQ			Efetividade do bloqueio para MICA	
	Células Vivas (%)	MICA		Células Vivas (%)	MICA		expressão (%)	MFI (%)
		expressão (%)	MFI		expressão (%)	MFI		
1	86,7	28,4	2046	87,2	12,5	1616	55,9	21,0
2	94,0	34,0	2377	94,6	22,5	2046	33,8	13,9
3	95,2	43,2	2145	95,4	8,56	1761	80,2	17,9
4	91,2	56,1	2584	93,9	44,9	2184	19,9	15,5
5	87,0	22,4	2778	88,3	7,75	1290	65,4	53,6
6	94,8	42,2	2041	96,0	13,1	1349	68,9	33,9
7	95,1	24,8	1644	95,7	6,43	1169	74,1	28,9
8	91,2	38,2	1841	95,5	13,9	1141	63,6	38,0
9	93,2	49,7	2241	95,1	18,6	1418	62,6	36,7
10	91,3	43,8	1368	93,0	12,3	876	71,9	36,0
11	85,6	48,7	1110	88,6	18,4	733	62,2	34,0
<b>Mediana</b>	<b>91,3</b>	<b>42,2</b>	<b>2046</b>	<b>94,6</b>	<b>13,1</b>	<b>1349</b>	<b>63,6</b>	<b>33,9</b>
(min-max)	(85,6-95,2)	(22,4-56,1)	(1110-2778)	(87,2-96,0)	(6,4-44,9)	(733-2184)	(19,9-80,2)	(13,9-53,6)

MFI: mediana de intensidade de fluorescência; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para a proteína MICA; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o marcador LIVE/DEAD™ FixableAqua (descrito no item 3.9.1, Métodos).

**Tabela 2.** Análise da intensidade de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, entre as subpopulações de células NK, no grupo de mulheres com endometriose e controles, no estado basal de cultura (sem estímulo).

A) Grupo endometriose

Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)												
EDT	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
Subpopulações	n	med	min-max	$p$	n	med	min-max	$p$	n	med	min-max	$p$
NK totais	21	358	217-449		21	84	36-321		17	127	3-263	
CD56 <sup>dim</sup>	21	350	206-426		21	84	37-324		18	119	3-252	
CD56 <sup>bright</sup>	18	469	362-606		18	81	35-304		15	143	74-265	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	347	3-454	< 0,0001	20	76	35-313	ns	17	90	3-452	0,0164
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	303	222-460		20	80	38-339		17	144	119-253	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA		4	NA	NA		4	NA	NA	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	462	362-659		16	69	34-297		13	158	125-245	

EDT: grupo endometriose; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Kruskal-Wallis*;

**CD107a:** CD56<sup>bright</sup> > NK totais ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,0001$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > NK totais ( $p \leq 0,01$ ), CD56<sup>dim</sup> > CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> > CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,0001$ ), diferenças entre subpopulações com teste *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn*.

**IL-10:** CD56<sup>bright</sup> > NK totais ( $p = 0,0358$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p = 0,0293$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> > ( $p = 0,0329$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup> > ( $p = 0,0104$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p = 0,0199$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p = 0,0477$ ), diferenças entre subpopulações com teste *Kruskal-Wallis* e com pós teste de *Mann-Whitney*.

B) Grupo controle

Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)												
CTR	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10			
Subpopulações	n	med	min-max	$p$	n	med	min-max	$p$	n	med	min-max	$p$
NK totais	20	336	209-411		20	97	6-210		16	49	1-166	
CD56 <sup>dim</sup>	20	328	208-413		20	99	3-231		16	37	1-164	
CD56 <sup>bright</sup>	18	452	312-556		18	93	72-215		16	132	70-195	
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	19	322	208-404	< 0,0001	19	93	3-201	ns	16	3	1-176	< 0,0001
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	19	340	231-439		19	122	71-254		15	140	123-184	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	9	489	281-530		9	155	76-224		8	83	3-140	
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	438	309-573		15	104	73-214		13	143	92-209	

CTR grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste inicial de *Kruskal-Wallis*; diferenças entre subpopulações com teste *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn*;

**CD107a:** CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> ( $p \leq 0,05$ )

**IL-10:** CD56<sup>bright</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > NK totais ( $p \leq 0,01$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,01$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,001$ ), CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > NK totais ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> > CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> ( $p \leq 0,01$ ).

**Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**A) NK totais**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	Células NK totais					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	13,2	17,8	3,6	2,9	-0,1	-0,3
P055	62,6	25,8	23,5	5,5	6,9	-0,7	-0,6
P059	80,2	6,7	9,8	2,6	3,0	NT	NT
P066	NT	10,0	23,7	11,6	12,1	-0,8	-0,6
P069	19,9	13,2	18,2	-0,5	1,5	1,1	0,6
P071	68,9	26,9	25,9	4,0	3,3	-0,1	0,6
P077	19,9	32,2	26,2	2,4	0,5	0,3	-0,3
P090	65,4	9,6	7,3	-0,7	-0,8	-0,3	-0,6
P091	74,1	3,5	6,4	3,9	2,2	-0,4	-0,4
P118	80,2	17,9	11,6	-10,8	-7,1	0,7	0,2
P128	55,9	18,9	16,8	7,6	7,1	NT	NT
P132	NT	12,3	14,7	7,5	9,4	0,4	0,4
P137	80,2	5,7	6,2	6,1	-3,0	NT	NT
P139	62,6	14,5	15,9	4,2	4,5	-0,4	0,1
P140	63,6	23,4	18,9	8,6	9,1	0,7	0,4
P141	62,6	7,5	6,9	2,0	3,1	-0,3	-0,2
P145	19,9	32,7	45,3	2,9	5,9	0,8	0,8
P146	33,8	13,8	5,2	4,6	1,8	3,2	-0,2
P147	62,6	15,9	9,8	2,1	0,9	0,4	0,2
P148	62,6	15,7	17,9	3,2	5,6	-0,3	-0,2
P155	NT	60,4	18,8	0,4	2,1	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>14,5</b>	<b>16,8</b>	<b>3,6</b>	<b>3,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,2</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(3,5-60,4)	(5,2-45,3)	(-10,3-11,6)	(-7,1-12,1)	(-0,8-3,2)	(-0,6-0,8)

EDT	% bloqueio para MICA em K562	Células NK totais					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	74	71	5	4	-8	-10
P055	36,7	73	90	9	12	22	33
P059	17,9	-13	-15	17	-9	NT	NT
P066	NT	90	135	13	11	23	19
P069	15,5	10	83	-56	-29	-44	-31
P071	33,9	86	46	14	11	18	-8
P077	15,5	221	208	-66	-69	-85	-98
P090	53,6	50	40	-2	1	-8	-2
P091	28,9	-8	-1	-8	-9	-11	-21
P118	17,9	34	87	-39	-11	19	28
P128	21,0	146	127	18	10	NT	NT
P132	NT	40	49	13	19	10	16
P137	17,9	54	42	1	-24	NT	NT
P139	36,7	37	37	13	13	18	0
P140	38,0	90	71	12	12	-2	0
P141	36,7	40	57	-2	1	-13	-16
P145	15,5	89	175	-23	32	-28	12
P146	13,9	134	12	0	-2	10	-14
P147	36,7	49	46	-1	-2	0	0
P148	36,7	75	83	-5	0	0	2
P155	NT	-14	24	-17	-3	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>54,0</b>	<b>57,0</b>	<b>-0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
(min-max)	(13,9-53,6)	(-14-221)	(-15-208)	(-66-18)	(-69-32)	(-85-23)	(-98-33)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão), min: valor mínimo, max: valor máximo. K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo) K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo) NT: não testado; valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	Células NK totais					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	17,0	17,8	3,0	2,6	0,1	0,2
C28	74,1	21,2	13,0	7,5	5,3	0,1	NT
C30	19,9	-5,1	19,7	1,0	-0,3	0,6	0,6
C32	NT	18,0	NT	6,4	NT	0,9	NT
C33	33,8	28,4	25,5	4,1	5,7	0,5	0,3
C35	19,9	34,4	47,0	4,3	5,3	-0,9	-1,0
C38	80,2	18,2	16,2	5,1	11,2	-0,1	-0,1
C39	NT	26,8	15,4	9,4	7,6	-0,3	1,4
C42	68,9	41,1	42,2	14,9	15,5	-0,2	0,1
C43	68,9	26,4	-0,9	4,6	0,4	0,4	0,6
C44	68,9	4,2	4,7	0,1	-0,2	NT	NT
C66	68,9	15,1	16,1	2,0	3,2	0,0	1,6
C72	74,1	13,2	8,9	4,2	2,1	NT	NT
C73	62,2	20,3	23,3	3,8	4,5	-0,5	0,0
C76	62,2	16,6	9,8	2,7	0,9	0,9	0,3
C77	74,1	34,8	17,3	3,7	6,3	-0,5	-0,4
C78	71,9	27,3	20,8	10,8	11,2	-0,3	0,2
C79	71,9	-6,4	7,8	1,2	2,2	NT	NT
C80	62,2	31,9	32,5	7,2	6,9	NT	NT
C81	62,2	30,2	31,1	10,5	3,5	0,5	1,5
mediana	68,9	20,7	17,3	4,2	4,5	0,0	0,3
(min-max)	(19,9 - 74,1)	(-6,4 - 41,1)	(-0,9 - 47,0)	(0,1 - 14,9)	(-0,3 - 15,5)	(-0,9 - 0,9)	(-1,0 - 1,6)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	Células NK totais					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	85	112	17	-8	31	24
C28	28,9	67	38	11	-2	-18	NT
C30	15,5	116	51	-1	18	-5	16
C32	NT	73	NT	12	NT	38	NT
C33	13,9	130	117	-10	-3	-17	-9
C35	15,5	122	195	-12	-9	-10	-21
C38	17,9	89	105	30	19	74	80
C39	NT	110	51	19	21	9	37
C42	33,9	141	199	42	56	52	100
C43	33,9	86	-2	-13	24	12	50
C44	33,9	145	17	-34	32	NT	NT
C66	33,9	47	87	13	16	55	56
C72	28,9	51	-41	-8	-38	NT	NT
C73	34,0	108	99	32	43	0	0
C76	34,0	53	23	25	18	16	0
C77	28,9	124	170	-2	1	-9	-11
C78	36,0	84	83	72	75	0	0
C79	36,0	22	72	54	125	NT	NT
C80	34,0	110	112	25	11	NT	NT
C81	34,0	180	198	37	56	0	56
mediana	33,9	98,5	87,0	14,8	18,0	4,7	19,8
(min-max)	(13,9 - 36,0)	(22 - 180)	(-41,0 - 199)	(-34 - 72)	(-38-125)	(-18-74)	(-21-100)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**B) CD56<sup>dim</sup>**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	12,7	18,6	3,6	3,1	-0,5	-0,3
P055	62,6	29,8	25,3	7,6	9,5	-0,1	-0,1
P059	80,2	8,3	6,1	4,5	-0,2	NT	NT
P066	NT	12,2	37,4	14,8	15,2	-1,0	0,5
P069	19,9	24,9	37,8	-1,5	2,1	1,8	0,2
P071	68,9	27,3	30,0	4,3	4,8	-0,3	0,3
P077	19,9	26,6	34,8	0,6	0,7	0,4	-0,3
P090	65,4	13,3	13,6	-0,8	-0,5	-0,5	-0,7
P091	74,1	3,1	6,1	4,1	2,2	-0,2	-0,1
P118	80,2	21,3	6,1	-10,8	-6,5	-0,8	-1,3
P128	55,90	17,8	16,7	10,2	8,3	0,5	-0,2
P132	NT	18,9	20,8	8,6	9,0	0,4	0,5
P137	80,2	10,8	8,6	8,9	-3,4	NT	NT
P139	62,6	13,0	16,8	4,1	4,4	-0,5	0,2
P140	63,6	37,4	20,6	10,9	10,8	0,1	0,2
P141	62,6	8,8	5,3	2,3	3,6	0,5	0,2
P145	19,9	34,1	26,4	2,5	5,3	-0,6	-0,5
P146	33,8	-6,1	-19,6	4,7	1,9	2,9	-0,2
P147	62,6	18,9	12,4	2,0	0,5	0,6	0,1
P148	62,6	16,4	18,5	3,9	6,6	-0,1	-0,2
P155	NT	14,3	20,2	0,8	2,5	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>16,4</b>	<b>18,5</b>	<b>4,1</b>	<b>3,1</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>
<b>(min-max)</b>	<b>(19,9-80,2)</b>	<b>(-6,1-37,4)</b>	<b>(-19,6-37,8)</b>	<b>(-10,8-14,8)</b>	<b>(-6,5-15,2)</b>	<b>(-1,0-2,9)</b>	<b>(-1,3-0,5)</b>

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	81	84	5	4	-9	-12
P055	36,7	85	95	14	17	31	47
P059	17,9	-33	-21	11	-12	NT	NT
P066	NT	97	139	18	15	38	35
P069	15,5	4	98	-58	-26	-51	-31
P071	33,9	98	87	23	17	25	6
P077	15,5	217	226	-57	-68	-70	-86
P090	53,6	41	41	-1	2	-2	3
P091	28,9	10	15	-5	-6	0	-9
P118	17,9	36	94	-38	-8	33	43
P128	21,0	147	143	23	13	18	1
P132	NT	38	48	15	21	10	16
P137	17,9	51	41	1	-22	NT	NT
P139	36,7	26	36	14	15	3	0
P140	38,0	88	64	13	13	-1	2
P141	36,7	39	69	-1	4	-11	-13
P145	15,5	98	176	-20	29	-26	13
P146	13,9	134	7	0	-2	9	-14
P147	36,7	44	40	0	-2	0	0
P148	36,7	70	84	-4	1	0	0
P155	NT	-26	18	-17	-2	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>51,0</b>	<b>69,0</b>	<b>-0,4</b>	<b>2,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>
<b>(min-max)</b>	<b>(13,9-53,6)</b>	<b>(-33-217)</b>	<b>(-21-226)</b>	<b>(-58-23)</b>	<b>(-68-29)</b>	<b>(-70-38)</b>	<b>(-86-47)</b>

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão), min: valor mínimo, max: valor máximo. K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo) K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo) NT: não testado, valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	21,3	30,7	3,4	2,4	0,2	0,3
C28	74,1	-2,4	-13,8	7,4	4,4	-0,4	NT
C30	19,9	-6,5	14,4	1,4	-0,2	0,8	0,5
C32	NT	21,3	NT	6,7	NT	0,9	NT
C33	33,8	29,9	27,4	4,1	5,7	0,5	0,3
C35	19,9	36,9	53,3	4,2	5,7	-0,8	-0,9
C38	80,2	23,8	14,4	5,7	10,1	0,4	-0,1
C39	NT	33,6	20,0	10,9	5,9	-0,2	1,5
C42	68,9	43,1	45,9	16,3	17,0	-0,1	0,3
C43	68,9	18,4	-2,0	4,9	0,4	0,5	0,6
C44	68,9	-0,6	2,1	0,2	0,0	NT	NT
C66	68,9	16,3	23,1	2,6	3,9	-0,2	1,1
C72	74,1	13,6	8,9	4,2	2,3	NT	NT
C73	62,2	22,0	25,0	3,2	4,5	-0,6	-0,1
C76	62,2	15,7	10,9	2,3	0,8	2,1	0,7
C77	74,1	39,5	46,8	4,0	6,7	-0,5	-0,2
C78	71,9	27,5	22,0	11,9	10,7	0,0	0,4
C79	71,9	-3,8	11,6	1,5	3,7	NT	NT
C80	62,2	28,3	33,1	9,2	8,3	NT	NT
C81	62,2	32,8	36,7	11,5	3,4	0,4	1,2
<b>mediana</b>	<b>68,9</b>	<b>21,6</b>	<b>22,0</b>	<b>4,2</b>	<b>4,4</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(-6,5-43,1)	(-13,8-53,3)	(0,2-16,3)	(-0,2-17)	(-0,8-2,1)	(-0,9-1,5)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	68	100	17	-7	32	27
C28	28,9	58	39	13	1	-16	NT
C30	15,5	123	50	-1	18	-5	15
C32	NT	72	NT	12	NT	39	NT
C33	13,9	129	117	-10	-3	-18	-9
C35	15,5	125	214	-13	-8	-11	-20
C38	17,9	82	94	29	24	65	80
C39	NT	107	49	21	22	9	36
C42	33,9	153	199	45	60	56	103
C43	33,9	81	-5	-15	22	23	61
C44	33,9	147	20	-32	34	NT	NT
C66	33,9	39	85	14	20	80	77
C72	28,9	52	-38	-9	-37	NT	NT
C73	34,0	113	102	38	50	0	0
C76	34,0	50	24	26	17	3	0
C77	28,9	127	177	-3	2	-12	-13
C78	36,0	86	85	72	67	0	0
C79	36,0	32	87	57	138	NT	NT
C80	34,0	132	161	28	9	NT	NT
C81	34,0	188	207	46	64	0	59
<b>mediana</b>	<b>33,9</b>	<b>96,5</b>	<b>87,0</b>	<b>15,6</b>	<b>20,1</b>	<b>1,5</b>	<b>21,2</b>
(min-max)	(13,9-36)	(32-188)	(-38-214)	(-32-72)	(-37-138)	(-18-80)	(-20-103)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**C) CD56<sup>bright</sup>**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	18,2	10,8	4,7	1,3	2,0	0,6
P055	62,6	17,6	20,1	5,2	7,8	-2,9	-2,4
P059	80,2	NA	12,6	NA	-1,0	NT	NT
P066	NT	4,6	27,8	2,7	6,4	0,4	-1,1
P069	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P071	68,9	29,0	NA	0,7	NA	0,0	NA
P077	19,9	34,4	31,3	0,6	-0,7	1,1	0,4
P090	65,4	9,5	12,6	-4,0	-5,1	1,9	-0,6
P091	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	80,2	17,6	15,6	4,0	11,0	-5,0	-5,4
P128	55,90	30,2	26,7	4,3	4,3	1,0	0,5
P132	NT	17,7	16,3	8,2	5,0	-0,2	-0,2
P137	80,2	5,2	12,2	8,3	1,8	NT	NT
P139	62,6	23,5	13,4	10,5	4,8	0,0	-0,1
P140	63,6	12,9	-1,3	-0,2	1,2	0,1	0,1
P141	62,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	19,9	44,1	NA	0,9	NA	1,8	NA
P146	33,8	28,4	18,4	4,1	-0,1	4,9	0,3
P147	62,6	22,2	21,3	8,0	7,5	-0,6	0,0
P148	62,6	19,9	21,1	4,4	7,4	-1,5	-1,3
P155	NT	12,7	24,1	1,7	2,4	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>18,2</b>	<b>17,3</b>	<b>4,1</b>	<b>3,4</b>	<b>0,1</b>	<b>-0,1</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(4,6-44,1)	(-1,3-31,3)	(-4,0-10,5)	(-5,1-11,0)	(-5,0-4,9)	(-5,4-0,6)

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38	54	33	4	1	7	-4
P055	37	62	98	-1	-4	-14	-22
P059	18	NA	23	NA	-68	NT	NT
P066	NT	40	90	-2	-1	-5	-12
P069	16	NA	NA	NA	NA	NT	NA
P071	34	42	NA	-18	NA	-21	NA
P077	16	170	298	-72	-84	-51	-53
P090	54	34	26	0	0	-10	-10
P091	29	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	18	23	53	-51	-30	-41	-39
P128	21	161	116	6	4	1	-16
P132	NT	60	65	0	2	9	19
P137	18	57	55	-6	-37	NT	NT
P139	37	118	99	9	4	-6	-9
P140	38	30	58	2	8	-3	4
P141	37	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	16	44	NA	-28	NA	-46	NA
P146	14	205	51	10	0	7	-19
P147	37	84	75	2	4	-28	-15
P148	37	112	123	-9	-1	-45	-22
P155	NT	-54	22	-20	-7	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31</b>	<b>57</b>	<b>62</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>-10</b>	<b>-15</b>
(min-max)	(14-54)	(-54-205)	(22-298)	(-72-10)	(-84-8)	(-51-9)	(-53-19)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiram o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	39,3	39,6	4,3	5,4	0,4	0,4
C28	74,1	NA	28,7	NA	15,8	NT	NT
C30	19,9	16,0	0,0	-1,5	-1,8	0,6	-0,1
C32	NT	16,3	NT	3,6	NT	-0,7	NT
C33	33,8	55,4	48,6	6,6	6,6	-0,1	-0,1
C35	19,9	19,7	21,0	-0,5	1,0	-0,6	-1,0
C38	80,2	8,7	18,0	1,9	11,2	-0,8	1,4
C39	NT	6,4	2,5	3,7	5,3	-1,9	-0,7
C42	68,9	48,6	35,2	11,3	21,4	-1,4	-1,4
C43	68,9	58,5	15,5	8,3	0,7	1,0	NT
C44	68,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	68,9	23,0	14,4	3,4	5,8	2,1	1,6
C72	74,1	26,4	17,4	11,9	4,2	NT	NT
C73	62,2	46,8	43,9	4,7	2,7	-6,2	-4,9
C76	62,2	41,0	24,1	9,5	12,0	8,7	-0,5
C77	74,1	20,1	25,6	5,7	9,0	2,1	0,8
C78	71,9	22,2	41,3	11,2	14,3	NA	4,8
C79	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	62,2	14,9	5,0	1,3	3,7	NT	NT
C81	62,2	36,6	38,0	10,3	6,8	-3,2	-2,4
<b>mediana</b>	<b>68,9</b>	<b>23,0</b>	<b>24,1</b>	<b>4,7</b>	<b>5,8</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,1</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(6,4-58,5)	(0-48,6)	(-1,5-11,9)	(-1,8-21,4)	(-6,2-8,7)	(-4,9-4,8)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	224	220	21	-6	3	-17
C28	28,9	NA	62	NA	-2	NT	NT
C30	15,5	117	52	6	6	-17	12
C32	NT	92	NT	11	NT	19	NT
C33	13,9	219	186	-5	2	-14	-13
C35	15,5	79	168	-30	-27	-13	-30
C38	17,9	96	143	18	8	23	23
C39	NT	96	75	15	24	0	NT
C42	33,9	777	546	46	44	18	22
C43	33,9	240	-3	-8	30	-12	NT
C44	33,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	33,9	62	81	7	5	9	8
C72	28,9	103	-33	5	-32	NT	NT
C73	34,0	214	192	64	64	31	10
C76	34,0	102	39	38	31	5	-4
C77	28,9	83	159	-1	4	-4	-20
C78	36,0	80	30	41	24	NA	22
C79	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	34,0	22	-29	17	33	NT	NT
C81	34,0	193	183	13	25	-1	-1
<b>mediana</b>	<b>33,9</b>	<b>102</b>	<b>81</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
(min-max)	(13,9-36,0)	(22-777)	(-33-546)	(-30-64)	(-32-64)	(-17-31)	(-30-23)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa, NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo, max: valor máximo. K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo) K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiu o valor de corte ( $\geq 100$ ), valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**D) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	32,1	15,8	0,3	-0,2	-0,7	-0,4
P055	62,6	28,0	35,4	3,1	6,6	-0,3	1,3
P059	80,2	20,5	28,7	17,6	-5,4	NT	NT
P066	NT	9,0	31,4	9,2	8,8	-1,1	-0,3
P069	19,9	-12,0	60,7	1,0	-3,0	1,3	0,0
P071	68,9	38,1	29,4	0,0	-0,4	-0,6	-0,6
P077	19,9	19,6	39,2	0,7	-0,7	1,0	-0,1
P090	65,4	8,3	17,2	0,2	0,3	-1,1	0,3
P091	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	80,2	26,9	13,7	-9,4	-10,6	-0,1	0,8
P128	55,9	37,0	34,3	8,6	6,6	1,3	0,8
P132	NT	15,9	16,3	5,8	4,7	0,5	0,7
P137	80,2	9,3	5,8	6,6	-4,7	NT	NT
P139	62,6	15,6	18,0	3,6	5,8	-0,8	-0,1
P140	63,6	45,7	36,7	5,2	4,2	0,3	0,4
P141	62,6	22,6	34,0	5,9	9,6	-0,5	-0,5
P145	19,9	31,7	58,3	-1,8	-0,4	0,0	0,3
P146	33,8	-5,7	-20,6	3,0	3,3	3,1	0,1
P147	62,6	21,6	18,8	1,9	0,1	0,6	0,0
P148	62,6	20,0	29,3	2,9	3,8	-0,4	-0,7
P155	NT	16,1	27,5	3,3	7,5	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>20,3</b>	<b>29,0</b>	<b>3,0</b>	<b>1,8</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(-12-45,7)	(-20,6-60,7)	(-9,4-17,6)	(-10,6-9,6)	(-1,1-3,1)	(-0,7-1,3)

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	68	51	2	2	-14	-9
P055	36,7	58	74	-3	13	0	0
P059	17,9	27	84	-5	-25	NT	NT
P066	NT	74	112	13	8	24	29
P069	15,5	-27	55	-73	-60	-146	-137
P071	33,9	81	12	11	-15	79	47
P077	15,5	163	167	-74	-88	-245	-255
P090	53,6	12	25	-5	0	-29	-12
P091	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	17,9	55	109	-45	-19	42	67
P128	21,0	148	131	19	7	0	0
P132	NT	28	32	9	13	12	16
P137	17,9	47	35	-5	-26	NT	NT
P139	36,7	0	0	16	17	41	47
P140	38,0	61	45	5	5	-9	3
P141	36,7	149	166	16	12	0	0
P145	15,5	60	164	-38	15	-27	24
P146	13,9	126	0	-4	-4	7	-14
P147	36,7	44	60	-1	-5	0	0
P148	36,7	60	73	-5	-2	0	0
P155	NT	-16	41	-17	0	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>59,0</b>	<b>57,5</b>	<b>-3,3</b>	<b>-0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
(min-max)	(13,9-53,6)	(-27-163)	(0-167)	(-74-19)	(-88-17)	(-245-79)	(-255-67)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiram o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	29,2	36,7	1,9	0,4	0,4	0,2
C28	74,1	11,4	10,4	9,6	6,1	-0,4	NT
C30	19,9	-6,1	-24,9	0,8	0,4	0,6	0,8
C32	NT	25,4	NT	4,4	NT	1,0	NT
C33	33,8	-3,3	30,8	3,9	5,5	0,3	0,2
C35	19,9	30,1	45,6	-0,6	-1,0	-1,4	-1,3
C38	80,2	38,3	38,1	18,5	18,5	0,7	0,0
C39	NT	32,5	18,9	7,5	6,5	-0,4	1,4
C42	68,9	39,0	45,0	4,1	7,8	-0,3	1,1
C43	68,9	26,4	-2,5	1,1	0,0	0,7	NT
C44	68,9	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C66	68,9	28,2	27,2	-2,6	-0,1	0,5	1,0
C72	74,1	12,2	3,7	0,8	-0,5	NT	NT
C73	62,2	27,9	25,8	1,2	1,6	-0,9	-0,6
C76	62,2	18,8	9,8	3,3	0,0	1,3	-0,9
C77	74,1	33,3	12,7	1,0	3,1	-0,1	0,6
C78	71,9	29,1	36,8	9,7	10,1	0,4	0,5
C79	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	62,2	42,7	45,8	13,9	8,4	NT	NT
C81	62,2	47,3	-14,1	17,6	3,6	0,6	0,5
<b>mediana</b> (min-max)	<b>68,9</b> (19,9-80,2)	<b>28,6</b> (-6,1-47,3)	<b>25,8</b> (-24,9-45,8)	<b>3,6</b> (-2,6-18,5)	<b>3,1</b> (-1,0-18,5)	<b>0,4</b> (-1,4-1,3)	<b>0,5</b> (-1,3-1,4)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	71	104	18	-10	14	19
C28	28,9	61	79	8	-3	-18	NT
C30	15,5	-231	-231	3	14	337	278
C32	NT	62	NT	10	NT	38	NT
C33	13,9	141	125	-10	-3	-17	-7
C35	15,5	51	127	-14	-15	-18	-11
C38	17,9	114	139	28	13	0	0
C39	NT	96	42	16	20	9	39
C42	33,9	78	170	23	40	0	0
C43	33,9	76	-4	-21	23	7	NT
C44	33,9	NA	NT	NA	NT	NA	NT
C66	33,9	75	77	24	24	0	0
C72	28,9	40	-48	-15	-43	NT	NT
C73	34,0	112	94	22	35	0	0
C76	34,0	53	26	43	31	0	0
C77	28,9	109	150	-8	-5	-13	-13
C78	36,0	74	75	31	32	0	0
C79	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	34,0	178	278	38	22	NT	NT
C81	34,0	276	239	49	65	0	0
<b>mediana</b> (min-max)	<b>33,9</b> (13,9-36,0)	<b>75,5</b> (-213-276)	<b>94,0</b> (-213-278)	<b>17,0</b> (-21-49)	<b>20,0</b> (-43-65)	<b>0,0</b> (-18-337)	<b>0,0</b> (-13-278)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiu o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**E) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>**

- Grupo endometriose

		células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>					
EDT	% bloqueio para MICA em K562	CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	10,7	26,4	6,3	5,9	0,2	0,3
P055	62,6	29,6	23,0	9,6	10,5	-0,1	-0,1
P059	80,2	-2,3	-5,4	5,1	1,5	NT	NT
P066	NT	6,4	19,4	18,9	23,3	-1,5	0,5
P069	19,9	22,7	25,6	-0,8	5,7	-0,2	-0,3
P071	68,9	30,7	34,6	8,1	7,5	-1,9	5,1
P077	19,9	26,7	28,7	2,4	2,4	0,1	-0,2
P090	65,4	25,6	24,4	-1,7	0,7	1,3	0,2
P091	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	80,2	15,5	-3,9	-17,8	-14,8	-1,4	-2,3
P128	55,9	13,4	14,6	7,5	9,1	-0,5	-0,9
P132	NT	26,2	31,8	25,6	32,3	2,0	1,3
P137	80,2	17,4	22,7	13,7	6,1	NT	NT
P139	62,6	8,4	4,6	4,5	5,2	0,7	1,0
P140	63,6	19,7	16,7	14,8	20,1	-0,1	0,6
P141	62,6	-3,8	-9,0	1,7	2,4	0,3	0,5
P145	19,9	23,3	31,0	3,6	7,0	-0,9	-0,3
P146	33,8	-4,3	-15,4	9,8	10,2	2,9	-0,7
P147	62,6	19,8	8,0	3,8	1,0	-0,3	-0,5
P148	62,6	16,7	21,6	9,1	11,3	-0,1	-0,7
P155	NT	5,7	10,1	0,0	1,1	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>17,1</b>	<b>20,5</b>	<b>5,7</b>	<b>6,0</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,1</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(-4,3-30,7)	(-15,4-34,6)	(-17,8-25,6)	(-14,8-32,3)	(-1,9-2,9)	(-2,3-5,1)

		células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>					
EDT	% bloqueio para MICA em K562	CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	123	140	7	7	-12	-19
P055	36,7	85	97	12	14	-17	-9
P059	17,9	-12	-18	35	-3	NT	NT
P066	NT	141	191	22	25	3	-6
P069	15,5	62	183	-110	-72	-35	-18
P071	33,9	115	244	32	52	-23	-29
P077	15,5	388	252	-50	-46	-37	-40
P090	53,6	74	50	-6	3	-13	10
P091	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	17,9	26	112	-31	5	-16	-4
P128	21,0	144	154	28	23	24	7
P132	NT	135	205	73	96	-5	0
P137	17,9	111	131	21	-9	NT	NT
P139	36,7	46	30	7	13	6	0
P140	38,0	138	134	20	24	4	-5
P141	36,7	14	32	-2	8	-3	-3
P145	15,5	147	196	-14	38	-32	3
P146	13,9	183	39	13	12	14	-13
P147	36,7	44	25	2	-4	-20	-27
P148	36,7	95	103	7	13	-9	-8
P155	NT	-39	3	-17	0	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>103,0</b>	<b>121,5</b>	<b>7,0</b>	<b>9,9</b>	<b>-12,0</b>	<b>-6,0</b>
(min-max)	(13,9-53,6)	(-39-388)	(-18-252)	(-110-73)	(-72-96)	(-37-24)	(-40-10)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiram o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	12,3	18,3	3,3	3,5	-0,3	-0,1
C28	74,1	-16,8	-16,6	5,1	2,3	NT	NT
C30	19,9	-4,4	12,1	1,7	-0,7	0,7	0,7
C32	NT	25,1	NT	12,2	NT	0,1	NT
C33	33,8	16,2	13,7	4,4	7,1	0,4	0,2
C35	19,9	42,4	56,5	6,0	9,0	-0,4	-1,0
C38	80,2	7,5	-6,3	2,0	1,7	-0,2	-0,5
C39	NT	39,0	30,6	29,3	25,2	-0,9	-0,2
C42	68,9	42,0	35,1	30,3	22,0	0,1	0,2
C43	68,9	14,8	-1,7	9,7	0,5	0,8	0,1
C44	68,9	-7,7	-1,0	0,2	0,0	NT	NT
C66	68,9	4,8	10,4	3,7	3,8	-0,9	0,6
C72	74,1	22,7	13,3	13,6	6,2	NT	NT
C73	62,2	15,7	27,1	8,4	9,7	-1,6	-0,7
C76	62,2	17,2	13,3	2,4	1,4	3,3	1,6
C77	74,1	32,3	44,6	8,2	12,5	-0,7	-1,0
C78	71,9	25,2	25,1	13,1	14,8	0,4	1,4
C79	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	62,2	9,3	14,0	9,7	10,9	NT	NT
C81	62,2	18,8	20,7	12,6	2,8	1,1	1,7
<b>mediana</b>	<b>68,9</b>	<b>16,2</b>	<b>13,9</b>	<b>8,2</b>	<b>5,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(-16,8-42,4)	(-16,6-56,5)	(0,2-30,3)	(-0,7-25,2)	(-1,6-3,3)	(-1,0-1,7)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	70	99	16	-3	-5	-11
C28	28,9	50	12	18	3	NT	NT
C30	15,5	149	41	-4	10	-9	5
C32	NT	155	NT	21	NT	3	NT
C33	13,9	84	81	-17	-8	-18	-14
C35	15,5	330	321	-11	-6	-6	-27
C38	17,9	77	82	6	1	-3	1
C39	NT	276	162	82	59	-21	-12
C42	33,9	488	233	83	72	14	14
C43	33,9	90	1	-14	14	-19	28
C44	33,9	106	-14	-42	45	NT	NT
C66	33,9	15	84	9	14	-5	6
C72	28,9	106	-7	16	-22	NT	NT
C73	34,0	120	212	21	45	-21	-37
C76	34,0	37	10	0	1	5	-2
C77	28,9	155	226	6	15	1	-3
C78	36,0	235	440	50	68	-7	15
C79	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	34,0	59	27	27	12	NT	NT
C81	34,0	98	166	14	4	-4	-8
<b>mediana</b>	<b>33,9</b>	<b>106,0</b>	<b>83,0</b>	<b>14,0</b>	<b>11,0</b>	<b>-5,0</b>	<b>-2,5</b>
(min-max)	(13,9-36,0)	(15-488)	(-14-440)	(-42-83)	(-22-72)	(-21-14)	(-37-28)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiu o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**F) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P055	62,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P059	80,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P066	NT	-1,3	36,5	5,9	9,7	1,8	0,4
P069	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P071	68,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P077	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P090	65,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P091	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	80,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P128	55,90	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P132	NT	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P137	80,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P139	62,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P140	63,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P141	62,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P146	33,8	39,6	3,2	-6,1	-4,1	6,2	0,6
P147	62,6	7,4	0,2	2,2	5,7	-0,7	1,1
P148	62,6	14,8	9,7	2,0	7,0	-2,5	2,7
P155	NT	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>11,1</b>	<b>6,4</b>	<b>2,1</b>	<b>6,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(-1,3-39,6)	(0,2-36,5)	(-6,1-5,9)	(-4,1-9,7)	(-2,5-6,2)	(0,4-2,7)

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P055	36,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P059	17,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P066	NT	74	110	-3	-6	-16	-9
P069	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P071	33,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P077	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P090	53,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P091	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	17,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P128	21,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P132	NT	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P137	17,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P139	36,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P140	38,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P141	36,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P146	13,9	118	-61	8	-5	26	-20
P147	36,7	39	42	-4	-4	0	0
P148	36,7	44	67	-8	-9	-40	-3
P155	NT	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>59,0</b>	<b>54,5</b>	<b>-3,4</b>	<b>-5,4</b>	<b>-8,0</b>	<b>-6,0</b>
(min-max)	(13,9-53,6)	(39-118)	(-61-110)	(-8-8)	(-9 - -4)	(-40-26)	(-20-0)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiram o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	37,0	30,3	0,3	-0,4	0,8	0,3
C28	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C30	19,9	8,6	51,0	-1,0	0,9	0,0	3,3
C32	NT	16,9	NT	6,7	NT	16,9	NT
C33	33,8	51,2	48,3	2,1	5,6	0,0	0,3
C35	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C38	80,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C39	NT	6,0	5,1	4,5	6,6	-3,7	-1,5
C42	68,9	32,3	45,5	8,2	27,7	5,3	0,0
C43	68,9	21,2	20,5	-4,5	-5,8	3,4	NT
C44	68,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	68,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C72	74,1	2,2	2,7	-0,8	-0,8	NT	NT
C73	62,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C76	62,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C77	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C78	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C79	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	62,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C81	62,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>mediana</b>	<b>68,9</b>	<b>19,1</b>	<b>30,3</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(2,2-51,2)	(2,7-51)	(-4,5-8,2)	(-5,8-27,7)	(-3,7-16,9)	(-1,5-3,3)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	180	155	18	-12	11	4
C28	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C30	15,5	126	434	3	-3	2	16
C32	NT	52	NT	9	NT	41	NT
C33	13,9	194	95	-3	6	-23	-9
C35	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C38	17,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C39	NT	139	99	2	9	23	54
C42	33,9	92	207	55	38	0	0
C43	33,9	82	-9	-27	47	15	NT
C44	33,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	33,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C72	28,9	84	-27	-2	-38	NT	NT
C73	34,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C76	34,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C77	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C78	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C79	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	34,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C81	34,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>mediana</b>	<b>33,9</b>	<b>109,0</b>	<b>99,0</b>	<b>2,5</b>	<b>6,4</b>	<b>11,0</b>	<b>4,0</b>
(min-max)	(13,9-36)	(52-194)	(-27-434)	(-27-55)	(-38-47)	(-23-41)	(-9-54)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiu o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles.

**G) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>**

- Grupo endometriose

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	63,6	26,8	33,7	5,7	3,7	1,3	0,2
P055	62,6	19,4	30,6	16,3	22,7	-7,7	-7,8
P059	80,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P066	NT	4,4	24,1	0,9	4,1	0,1	-1,4
P069	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P071	68,9	24,9	25,9	6,5	-1,8	0,3	-2,3
P077	19,9	14,6	21,6	-0,4	-4,3	-2,6	-3,5
P090	65,4	18,1	8,4	-0,7	-3,4	1,5	-0,5
P091	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	80,2	15,2	7,4	-19,6	-15,4	NT	NT
P128	55,90	37,2	36,1	3,4	4,5	2,4	0,5
P132	NT	14,3	14,7	7,1	5,1	-0,1	0,3
P137	80,2	10,7	11,1	4,2	-7,5	NT	NT
P139	62,6	25,8	19,2	9,7	5,0	-0,7	-1,3
P140	63,6	21,3	-4,2	8,4	2,9	-0,6	0,1
P141	62,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	19,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P146	33,8	37,4	34,3	6,7	1,2	3,5	-0,6
P147	62,6	28,3	28,9	7,9	7,8	-0,5	-0,6
P148	62,6	35,1	27,7	7,5	8,2	-0,8	-1,1
P155	NT	12,6	25,9	-2,2	-1,5	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>62,6</b>	<b>20,3</b>	<b>25,0</b>	<b>6,1</b>	<b>3,3</b>	<b>-0,1</b>	<b>-0,6</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(4,4-37,4)	(-4,2-36,1)	(-19,6-16,3)	(-15,4-22,7)	(-7,7-3,5)	(-7,8-0,5)

EDT	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
P054	38,0	61	52	6	3	13	-2
P055	36,7	121	191	13	27	-14	-28
P059	17,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P066	NT	31	79	-2	0	-6	-12
P069	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P071	33,9	38	-24	-11	-13	-19	-62
P077	15,5	130	238	-75	-80	-42	-34
P090	53,6	50	28	1	0	3	4
P091	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P118	17,9	26	35	-48	-31	NT	NT
P128	21,0	130	112	7	5	-19	-19
P132	NT	60	62	2	5	16	25
P137	17,9	53	43	-4	-34	NT	NT
P139	36,7	149	116	7	8	-15	-14
P140	38,0	21	54	12	10	4	7
P141	36,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P145	15,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P146	13,9	231	110	12	2	6	-22
P147	36,7	109	94	2	5	-37	-29
P148	36,7	162	172	-9	2	-22	-5
P155	NT	-69	-2	-20	-9	NT	NT
<b>mediana</b>	<b>31,4</b>	<b>60,5</b>	<b>70,5</b>	<b>1,4</b>	<b>2,0</b>	<b>-14,0</b>	<b>-14,0</b>
(min-max)	(13,9-53,6)	(-69-231)	(-24-238)	(-75-13)	(-80-27)	(-42-16)	(-62-25)

EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiram o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Continuação Tabela 3.** Frequência e intensidade de expressão, individuais, das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 nas subpopulações de células NK, com o estímulo de células K562 e estímulo de células K562 pós bloqueio para MICA, em mulheres com endometriose e controles

- Grupo controle

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (%)		IFN- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	68,9	40,4	42,0	4,4	6,8	-0,6	-0,6
C28	74,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C30	19,9	15,5	2,7	-0,6	-0,9	1,7	1,1
C32	NT	20,0	NT	5,1	NT	-1,0	NT
C33	33,8	38,0	35,8	8,5	8,3	-0,5	0,2
C35	19,9	38,1	21,9	0,5	2,2	0,5	-0,6
C38	80,2	18,4	23,0	18,8	21,1	-0,8	0,0
C39	NT	5,7	0,5	4,7	5,5	0,5	1,5
C42	68,9	52,6	33,2	11,5	21,1	-1,8	-1,8
C43	68,9	61,1	22,0	12,4	3,3	0,9	NT
C44	68,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	68,9	31,3	13,8	2,2	5,5	0,6	2,2
C72	74,1	11,9	5,4	8,5	1,7	NA	NA
C73	62,2	40,4	54,6	NA	NA	NA	NA
C76	62,2	28,4	13,2	8,9	8,4	10,9	0,0
C77	74,1	38,1	51,5	8,2	15,9	0,0	0,0
C78	71,9	28,9	NA	NA	NA	NA	NA
C79	71,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	62,2	9,0	5,9	1,5	3,1	NT	NT
C81	62,2	42,0	40,7	18,0	12,8	-3,0	-3,1
<b>mediana</b>	<b>68,9</b>	<b>31,3</b>	<b>22,0</b>	<b>8,2</b>	<b>6,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
(min-max)	(19,9-80,2)	(5,7-61,1)	(0,5-54,6)	(-0,6-18,8)	(-0,9-21,1)	(-3,10,9)	(-3,1-2,2)

CTR	% bloqueio para MICA em K562	células CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>					
		CD107a (MFI)		IFN- $\gamma$ (MFI)		IL-10 (MFI)	
		estímulo		estímulo		estímulo	
		K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ	K562	K562BLOQ
C27	33,9	234	250	21	-5	-9	-30
C28	28,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C30	15,5	121	34	1	9	-25	4
C32	NT	72	NT	10	NT	-4	NT
C33	13,9	235	222	-8	1	-10	-12
C35	15,5	127	201	-25	-21	-2	-23
C38	17,9	114	157	19	5	-15	-15
C39	NT	92	75	20	22	0	5
C42	33,9	1125	588	45	50	5	10
C43	33,9	512	33	7	25	-14	NT
C44	33,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C66	33,9	58	65	10	11	14	12
C72	28,9	74	-67	7	-31	NA	NA
C73	34,0	187	195	NA	NA	NA	NA
C76	34,0	115	23	31	11	8	-13
C77	28,9	91	326	-1	7	-14	-14
C78	36,0	100	NA	NA	NA	NA	NA
C79	36,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C80	34,0	12	-39	11	33	NT	NT
C81	34,0	210	164	26	43	15	32
<b>mediana</b>	<b>33,9</b>	<b>115,0</b>	<b>157,0</b>	<b>10,1</b>	<b>9,8</b>	<b>-4,0</b>	<b>-12,0</b>
(min-max)	(13,9-36)	(12-1125)	(-67-588)	(-25-45)	(-31-50)	(-25-15)	(-30-32)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes de pesquisa; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); min: valor mínimo; max: valor máximo; K562: estímulo com células K562 descontado o valor basal (sem estímulo); K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA, descontado o valor basal (sem estímulo); NT: não testado; NA: não analisado - número de eventos adquiridos no citômetro não atingiu o valor de corte ( $\geq 100$ ); valores negativos: valores onde o valor basal, sem estímulo, foi maior do que com estímulo.

**Tabela 4.** Análise de correlação entre a **frequência** de células com expressão das moléculas **CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10**, ou entre a **intensidade** de sua expressão, em subpopulações de células NK circulantes, com os níveis de MICA solúvel de mulheres com endometriose e de controles, na condição basal de cultura, sem estímulo.

A) Grupo endometriose

Sem estímulo (% de células com expressão)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0393</b>	<b>0,5</b>	21	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0277</b>	<b>0,5</b>	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	18	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns

EDT: grupo endometriose; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; sMICA: MICA solúvel; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; FP: fluido peritoneal; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); em negrito: valores de p significantes (p<0,05) e respectivos valores de r; em negrito e sublinhado: correlações diferenciais entre o grupo EDT e grupo controle; ns: não significativa (p $\geq$  0,05); as análises foram realizadas a partir de valores da mediana da porcentagem e da MFI de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas diferentes subpopulações de NK; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de p e r determinados pelo teste de correlação de Spearman.

**Continuação Tabela 4.** Análise de correlação entre a **frequência** de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, ou entre a **intensidade** de sua expressão, em subpopulações de células NK circulantes, **com os níveis de MICA solúvel** de mulheres com endometriose e de controles, na condição basal de cultura, sem estímulo

B) Grupo controle

Sem estímulo (% de células com expressão)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	17	ns	ns	17	<b>0.0316</b>	<b>0.5</b>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	<b>0.0249</b>	<b>0.6</b>	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	9	ns	ns	9	ns	ns	9	ns	ns	9	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns
Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	9	ns	ns	9	ns	ns	9	ns	ns	9	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns

CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; sMICA: MICA solúvel; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; FP: fluido peritoneal; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de *r*; em negrito e sublinhado: correlações diferenciais entre o grupo EDT e grupo controle ns: não significativa ( $p \geq 0,05$ ); as análises foram realizadas a partir de valores da mediana da porcentagem e da MFI de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas diferentes subpopulações de NK; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de *p* e *r* determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

**Tabela 5.** Análise de correlação entre a frequência de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, com os níveis de MICA solúvel, no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose e de controles, na condição com estímulo com células K562.

A) Grupo endometriose

Subpopulações	Estímulo com K562 (% de células com expressão)																	
	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0279</b>	<b>-0,5</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0373</b>	<b>-0,5</b>	18	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0468</b>	<b>-0,4</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0076</b>	<b>-0,6</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	<b>0,0413</b>	<b>-0,5</b>	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)																	
	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0279</b>	<b>-0,5</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0434</b>	<b>-0,4</b>	18	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0488</b>	<b>-0,4</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0435</b>	<b>-0,5</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns

B) Grupo controle

Subpopulações	Estímulo com K562 (% de células com expressão)																	
	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	<b>0,0032</b>	<b>-0,7</b>	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	15	<b>0,0190</b>	<b>-0,6</b>	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	14	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)																	
	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns	14	ns	ns	14	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns	8	ns	ns	7	ns	ns	7	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	13	<b>0,0140</b>	<b>-0,7</b>	13	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, sMICA: MICA solúvel, MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão), K562: estímulo com células K562, n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; FP: fluido peritoneal, NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro), em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ) e respectivos valores de  $r$ , em negrito e sublinhado: correlações diferenciais entre o grupo EDT e grupo controle ns: não significante ( $p \geq 0,05$ ); as análises foram realizadas a partir de valores de mediana da porcentagem de células com expressão e da MFI das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, nas diferentes subpopulações de NK; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de  $p$  e  $r$  determinados pelo teste de correlação de Spearman.

**Tabela 6.** Análise de correlação das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, em subpopulações de células NK circulantes, com os níveis de MICA solúvel, no soro e no fluido peritoneal, de mulheres com endometriose e controles, na condição com estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.

A) Grupo endometriose

Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	<b>0,0366</b>	<b>-0,5</b>	21	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	18	<b>0,0427</b>	<b>-0,5</b>	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	<b>0,0192</b>	<b>-0,5</b>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	<b>0,0444</b>	<b>-0,5</b>	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns

Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r	EDT (n)	p	r
NK totais	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	21	ns	ns	18	ns	ns	18	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	16	ns	ns	16	<b>0,0057</b>	<b>-0,7</b>	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	20	ns	ns	17	ns	ns	17	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	<b>0,0390</b>	<b>-0,5</b>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns

B) Grupo controle

Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	<b>0,0175</b>	<b>-0,6</b>	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	12	<b>0,0455</b>	<b>-0,6</b>	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	ns	ns	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	7	<b>0,0476</b>	<b>0,8</b>	7	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	13	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns	10	ns	ns	10	ns	ns

Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)																		
Subpopulações	CD107a x sMICA soro			CD107a x sMICA FP			IFN- $\gamma$ x sMICA soro			IFN- $\gamma$ x sMICA FP			IL-10 x sMICA soro			IL-10 x sMICA FP		
	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r	CTR (n)	p	r
NK totais	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	<b>0,0105</b>	<b>-0,7</b>	13	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	<b>0,0152</b>	<b>-0,7</b>	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	12	ns	ns	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	15	ns	ns	12	<b>0,0417</b>	<b>-0,6</b>	12	ns	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	16	ns	ns	13	<b>0,0012</b>	<b>-0,7</b>	13	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	7	ns	ns	7	ns	ns	7	ns	ns	7	ns	ns	5	ns	ns	5	ns	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	13	ns	ns	13	ns	ns	12	<b>0,0152</b>	<b>-0,7</b>	12	ns	ns	10	ns	ns	10	ns	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK: células *Natural Killer*; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; sMICA: MICA solúvel; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); n: número de pares de dados analisados para cada subpopulação; FP: fluido peritoneal; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); em negrito: valores de *p* significantes (*p*<0,05) e respectivos valores de *r*; em negrito e sublinhado: correlações diferenciais entre o grupo EDT e grupo controle ns: não significativa (*p*≥ 0,05); as análises foram realizadas a partir de valores de mediana da porcentagem de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10 e de suas MFIs, nas diferentes subpopulações de NK; níveis de sMICA analisados por ELISA (Resultados, item 4.3); valores de *p* e *r* determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

**Tabela 7.** Comparações das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição basal de cultura, sem estímulo.

A) Grupo endometriose

EDT															
Sem estímulo (% células com expressão)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		p	Prolif		p	Prolif		p						
	(n)	med		(n)	med		(n)	med							
NK totais	8	9,9	13	7,4	ns	8	1,5	13	1,7	ns	5	0,6	12	0,8	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	9,5	13	7,6	ns	8	2,2	13	1,8	ns	6	0,7	12	0,9	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	5,4	12	5,1	ns	6	1,2	12	1,7	ns	5	0,0	11	0,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	8,7	12	10,4	ns	8	3,1	12	2,1	ns	6	0,8	11	0,9	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	13,7	12	11,2	ns	8	1,5	12	1,9	ns	6	0,7	11	1,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	2	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	5,9	11	5,5	ns	5	2,7	11	2,9	ns	4	0,9	9	1,4	ns

EDT															
Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		p	Prolif		p	Prolif		p						
	(n)	med		(n)	med		(n)	med							
NK totais	8	361	13	358	ns	8	96	13	71	ns	5	125	12	127	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	350	13	350	ns	8	96	13	71	ns	6	109	12	119	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	455	12	478	ns	6	99	12	69	ns	4	127	11	162	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	366	12	347	ns	8	100	12	67	ns	6	47	11	121	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	335	12	282	ns	8	87	12	78	ns	6	148	11	143	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	2	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	434	11	476	ns	5	95	11	68	ns	4	157	9	158	ns

B) Grupo controle

CTR															
Sem estímulo (% células com expressão)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		p	Prolif		p	Prolif		p						
	(n)	med		(n)	med		(n)	med							
NK totais	11	9,2	9	7,8	ns	11	0,9	9	1,5	ns	8	0,7	8	0,5	ns
CD56 <sup>dim</sup>	11	10,6	9	12	ns	11	1,0	9	1,7	ns	8	0,7	8	0,6	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	9	4,8	9	6,9	ns	9	0,9	9	1,1	ns	8	0,6	8	0,9	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	10	10,8	9	8,1	ns	10	1,3	9	2,1	ns	8	0,6	8	0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	18,1	9	18,3	ns	10	1,1	9	1,5	ns	8	0,7	8	1,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	5	NA	4	NA	NA	5	NA	4	NA	NA	5	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	5,1	8	6,5	ns	8	0,5	7	0,3	ns	7	0,8	6	0,7	ns

CTR															
Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		p	Prolif		p	Prolif		p						
	(n)	med		(n)	med		(n)	med							
NK totais	11	355	9	310	ns	11	106	9	94	ns	8	17	8	67	ns
CD56 <sup>dim</sup>	11	350	9	305	ns	11	106	9	93	ns	8	15	8	57	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	9	466	9	444	ns	9	113	9	87	ns	8	132	8	135	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	10	335	9	305	ns	10	98	9	80	ns	8	3	8	32	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	347	9	331	ns	10	149	9	105	ns	8	139	8	140	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	5	NA	4	NA	NA	5	NA	4	NA	NA	5	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	471	8	435	ns	8	118	7	94	ns	7	168	6	141	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Prolif: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secret: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 8.** Comparações das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição basal de cultura, sem estímulo.

## A) CD107a

Subpopulações	Sem estímulo (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	9,9	11	9,2	ns	13	7,4	9	7,8	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	9,5	11	10,6	ns	13	7,6	9	11,8	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	5,4	9	4,8	ns	12	5,1	9	6,9	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	8,7	10	10,8	ns	12	10,4	9	8,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	13,7	10	18,0	ns	12	11,2	9	18,3	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	5	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	5,9	9	5,1	ns	11	5,5	8	6,5	ns
Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	361	11	355	ns	13	358	9	310	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	350	11	350	ns	13	350	9	305	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	455	9	466	ns	12	478	9	444	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	366	10	335	ns	12	347	9	305	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	335	10	347	ns	12	282	9	331	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	5	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	434	9	471	ns	11	476	8	435	ns

B) IFN- $\gamma$ 

Subpopulações	Sem estímulo (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	1,5	11	0,9	ns	13	1,7	9	1,5	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	<b>2,2</b>	11	1,0	<b>0,0252</b>	13	1,8	9	1,7	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	1,2	9	0,9	ns	12	1,7	9	1,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	3,1	10	1,3	ns	12	2,1	9	2,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	1,9	10	1,1	ns	12	1,9	9	1,5	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	5	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	<b>2,7</b>	8	0,5	<b>0,0101</b>	11	<b>2,9</b>	7	0,3	<b>0,0041</b>
Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	96	11	106	ns	13	71	9	94	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	95	11	106	ns	13	71	9	93	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	99	9	113	ns	12	69	9	87	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	100	10	98	ns	12	67	9	80	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	87	10	149	ns	12	78	9	105	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	5	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	95	8	118	ns	11	68	7	94	ns

## C) IL-10

Subpopulações	Sem estímulo (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	5	0,6	8	0,7	ns	12	0,8	8	0,5	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	0,7	8	0,7	ns	12	0,9	9	0,6	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	4	0,4	8	0,6	ns	11	0,4	7	1,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	0,8	8	0,6	ns	11	0,9	8	0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	0,7	8	0,6	ns	11	1,1	8	1,3	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	2	NA	5	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	0,9	7	0,9	ns	9	1,3	6	0,7	ns
Subpopulações	Sem estímulo (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	5	125	8	17	ns	12	127	8	67	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	109	8	15	ns	12	119	8	57	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	4	127	8	132	ns	11	162	8	135	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	47	8	15	ns	11	121	8	32	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	148	8	139	ns	11	143	8	140	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	2	NA	5	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	157	7	168	ns	9	158	6	141	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>; Proliferativa: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secretora: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em vermelho: maior valor de mediana na análise entre os grupos; negrito: valor de  $p$  significativo; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 9.** Comparações das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562.

A) Grupo endometriose

EDT															
Estímulo com K562 (% de células com expressão)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		<i>p</i>	Prolif		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>				
	(n)	med		(n)	med		(n)	med	(n)	med					
NK totais	8	14,5	13	14,5	ns	8	2,5	13	3,9	ns	5	0,3	12	-0,11	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	17,1	13	13,3	ns	8	3,1	13	4,1	ns	6	<b>0,45</b>	12	-0,4	<b>0,0302</b>
CD56 <sup>bright</sup>	5	19,9	12	17,9	ns	5	4,3	12	4,1	ns	4	0,4	11	0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	19,8	12	24,3	ns	8	4,6	12	2,4	ns	6	0,7	11	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	15,1	12	21,0	ns	8	3,8	12	6,5	ns	6	-0,1	11	0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	14,6	11	21,3	ns	5	3,4	11	6,5	ns	4	-0,5	9	0,1	ns

EDT															
Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		<i>p</i>	Prolif		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>				
	(n)	med		(n)	med		(n)	med	(n)	med					
NK totais	8	40	13	73	ns	8	-4	13	1	ns	5	-13	12	5	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	39	13	81	ns	8	-2	13	13	ns	6	-6	12	1	ns
CD56 <sup>bright</sup>	5	112	12	49	ns	5	-9	12	-1	ns	4	-22,1	11	-10	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	44	12	59	ns	8	-5	12	-2	ns	6	0	11	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	79	12	113	ns	8	3	12	10	ns	6	-7	11	-13	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	130	11	53	ns	5	-9	11	2	ns	4	-20,5	9	-6	ns

B) Grupo controle

CTR															
Estímulo com K562 (% de células com expressão)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		<i>p</i>	Prolif		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>				
	(n)	med		(n)	med		(n)	med	(n)	med					
NK totais	11	18,2	9	21,2	ns	11	4,6	9	4,2	ns	8	0,2	8	0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup>	11	21,3	9	21,9	ns	11	4,9	9	4,2	ns	8	0,5	8	-0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup>	9	20,1	8	31,5	ns	9	5,7	8	4,5	ns	7	0,6	7	-0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	9	29,1	9	28,2	ns	9	4,1	9	1,9	ns	8	<b>0,7</b>	8	0,0	<b>0,0281</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	15,9	9	16,2	ns	10	8,9	9	5,9	ns	8	0,3	7	-0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	28,4	8	38,0	ns	8	8,5	7	4,7	ns	7	-0,01	6	-0,01	ns

CTR															
Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a			IFN- $\gamma$			IL-10								
	Prolif		<i>p</i>	Prolif		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>				
	(n)	med		(n)	med		(n)	med	(n)	med					
NK totais	11	89	9	108	ns	11	25	9	13	ns	8	14	8	0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	11	86	9	107	ns	11	26	9	14	ns	8	13	8	0	ns
CD56 <sup>bright</sup>	9	96	8	148	ns	9	17	8	10	ns	7	5	7	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	9	76	9	75	ns	9	23	9	16	ns	8	0	8	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	10	128	9	98	ns	10	6	9	16	ns	8	-1	7	-6	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	114	8	157	ns	8	11	7	10	ns	7	-14	6	-1	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Prolif: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secret: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com K562: valores do estímulo com células K562 descontado o valor basal, descontado o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana, ns: valores de *p* não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor de maior mediana na comparação entre os grupos analisados; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 10.** Comparações das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562.

## A) CD107a

Subpopulações	Estímulo K562 (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	14,5	11	18,2	ns	13	14,5	9	21,2	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	17,1	11	21,3	ns	13	13,3	9	21,9	ns
CD56 <sup>bright</sup>	5	19,9	9	20,1	ns	12	17,9	8	31,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	19,8	9	29,1	ns	12	24,3	9	28,2	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	15,1	10	15,9	ns	12	18,5	9	16,2	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	14,6	9	28,4	ns	11	21,3	8	38,0	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	40	11	89	ns	13	73	9	108	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	39	11	86	ns	13	81	9	107	ns
CD56 <sup>bright</sup>	5	112	9	96	ns	12	49	8	148	0,0032
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	44	9	76	ns	12	59	9	75	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	79	10	128	0,195	12	113	9	98	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	4	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	130	9	114	0,974	11	53	8	157	0,0259

B) IFN- $\gamma$ 

Subpopulações	Estímulo K562 (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	2,5	11	4,9	ns	13	3,9	9	4,2	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	3,1	11	4,9	ns	13	4,1	9	4,2	ns
CD56 <sup>bright</sup>	5	4,3	9	5,7	ns	12	4,0	8	4,5	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	4,6	9	4,1	ns	12	2,4	9	1,9	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	3,8	10	8,9	ns	12	7,2	9	5,9	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	3,4	8	8,5	ns	11	6,5	7	4,7	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	8	-4	11	25	ns	13	1	9	13	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	-2	11	26	ns	13	1	9	14	ns
CD56 <sup>bright</sup>	5	-9	9	17	0,019	12	-1	8	10	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	-5	9	23	ns	12	-2	9	16	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	3	10	6	ns	12	10	9	16	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	4	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	-9	8	11	0,0186	11	2	7	10	ns

## C) IL-10

Subpopulações	Estímulo K562 (% de células com expressão)									
	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	5	0,3	8	0,2	ns	12	-0,1	8	0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	0,5	8	0,5	ns	12	-0,4	8	-0,2	ns
CD56 <sup>bright</sup>	4	0,4	7	0,56	ns	11	0,11	7	-0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	0,7	8	0,7	ns	11	-0,3	8	0,0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	-0,01	8	0,3	ns	11	-0,1	7	-0,4	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	-0,5	7	0,0	ns	9	R\$0,1	6	-0,01	ns
Subpopulações	Estímulo com K562 (intensidade de expressão, MFI)									
	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	p
NK totais	5	-13	8	14	0,0295	12	5	8	0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	-6	8	13	ns	12	1	8	0	ns
CD56 <sup>bright</sup>	4	-22	7	5	ns	11	-10	7	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	0	8	0	ns	11	0	8	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	-7	8	-1	ns	11	-13	7	-6	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	4	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	-21	7	-14	ns	9	-6	6	-1	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Proliferativa: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secretora: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com células K562: valores do estímulo descontado o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana, ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor de maior mediana na comparação entre os grupos analisados; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas ( $< 100$  eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 11.** Comparações das porcentagens de expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles, entre as fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.

A) Grupo endometriose

EDT															
Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)															
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10						
	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>
	(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	17,4	13	15,9	ns	8	3,0	13	2,9	ns	5	-0,2	12	-0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	19,4	13	16,8	ns	8	3,1	13	3,1	ns	6	-0,1	12	-0,1	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	22,6	11	15,6	ns	6	3,4	11	4,8	ns	4	0,1	10	-0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	31,7	12	18,4	ns	8	4,3	12	0,2	ns	6	-0,1	11	0,1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	18,1	12	18,5	ns	8	4,0	12	7,2	ns	6	-0,2	11	-0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	3	NA	NA	2	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	25,9	11	24,1	ns	5	4,5	11	2,9	ns	4	-0,4	9	-0,6	ns

EDT															
Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10						
	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>
	(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	70	13	46	ns	8	-2	13	4	ns	5	-16	12	0	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	77	13	64	ns	8	-1	13	4	ns	6	0	12	3	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	91	11	57	ns	6	-4	11	-0,2	ns	4	-19	10	-12	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	79	12	48	ns	8	-1	12	1	ns	6	0	11	3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	129	12	122	ns	8	4,0	12	13	ns	6	-6	11	-6	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	3	NA	NA	2	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	112	11	54	ns	5	2,2	11	2	ns	4	-12	9	-14	ns

B) Grupo controle

CTR															
Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)															
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10						
	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>
	(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med	
NK totais	10	16,8	9	17,8	ns	10	4,3	9	4,5	ns	7	0,2	7	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup>	10	14,4	9	24,9	ns	10	5,2	9	4,4	ns	7	0,5	7	0,3	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	8	21,1	9	28,7	ns	8	10,1	9	5,4	ns	6	0,4	7	-0,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	24,8	9	25,8	ns	8	5,5	9	1,6	ns	6	0,5	7	0,2	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	13,3	9	18,3	ns	9	1,7	9	6,2	ns	7	0,4	7	-0,1	0,62
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	3	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	7	22,0	6	-0,01	0,0012	7	8,4	7	5,5	ns	5	0,0	6	-0,2	ns

CTR															
Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)															
Subpopulações	CD107a				IFN- $\gamma$				IL-10						
	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>	Prolif		Secret		<i>p</i>
	(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med		(n)	med	(n)	med	
NK totais	10	78	9	99	ns	10	22	9	-2	ns	7	16	7	24	ns
CD56 <sup>dim</sup>	10	86	9	100	ns	10	23	9	1	ns	7	15	7	27	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	8	46	9	168	ns	8	27	9	2	ns	6	17	7	-1	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	107	9	94	ns	8	23	9	-3	ns	6	0	7	0	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	9	41	9	99	ns	9	14	9	3	ns	7	5	7	-12	0,0070
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	4	NA	NA	3	NA	4	NA	NA	3	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	7	34	8	179,5	ns	7	11	7	1	ns	5	-13	6	-4	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Prolif: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secret: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); estímulo com K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA – valores descontado o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); med: mediana; ns: valores de *p* não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito: valores de *p* significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor de maior mediana na comparação entre os grupos analisados; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas (< 100 eventos na aquisição do citômetro); valores de *p* determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 12.** Comparações das frequências de células com expressão das moléculas CD107a, IFN- $\gamma$  e IL-10, e de suas intensidades de expressão, nas diferentes subpopulações de células NK circulantes, entre mulheres com endometriose e controles, nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, na condição de estímulo com células K562 bloqueadas para MICA.

## A) CD107a

B) IFN- $\gamma$ 

## C) IL-10

Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	17,4	10	16,8	ns	13	15,9	9	17,8	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	19,4	10	14,4	ns	13	16,8	9	24,9	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	22,6	8	21,1	ns	9	17,0	9	28,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	31,7	8	24,8	ns	12	18,4	9	25,8	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	18,1	9	13,3	ns	12	21,0	9	18,3	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	25,9	7	22	ns	11	24,1	8	28,8	ns

Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA CD107a					SECRETORA CD107a				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	70	10	78	ns	13	46	9	99	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	77	10	86	ns	13	64	9	100	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	91	8	46	ns	9	55	9	<b>168</b>	<b>0,0336</b>
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	79	8	107	ns	12	48	9	94	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	129	9	41	ns	12	122	9	99	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	112	7	34	ns	11	54	8	180	ns

Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	3,1	10	4,3	ns	13	2,9	9	4,5	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	3,1	10	5,2	ns	13	3,1	9	4,4	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	3,4	8	10,1	ns	10	3,3	9	5,4	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	4,3	8	5,5	ns	12	0,2	9	1,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	4,0	9	1,7	ns	12	6,5	9	6,2	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	4,5	7	8,4	ns	11	2,9	7	5,5	ns

Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA IFN- $\gamma$					SECRETORA IFN- $\gamma$				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	8	-2	10	<b>22</b>	<b>0,0010</b>	13	4	9	-2	ns
CD56 <sup>dim</sup>	8	-1	10	<b>23</b>	<b>0,0021</b>	13	4	9	1	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	6	-4	8	<b>31</b>	<b>0,0013</b>	10	0	9	2	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	8	<b>-1</b>	8	-22	<b>0,0033</b>	12	1	9	-3	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	8	4	9	14	ns	12	13	9	3	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	3	NA	3	NA	NA	3	NA	4	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	5	2	7	<b>11</b>	<b>0,0051</b>	11	2	7	1	ns

Estímulo com K562BLOQ (% de células com expressão)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	5	-0,2	7	0,2	ns	12	-0,1	7	0,3	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	-0,4	7	0,4	ns	12	-0,1	7	0,3	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	4	0,1	6	0,4	ns	9	-0,1	7	-0,7	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	-0,1	6	0,5	ns	11	0,1	7	0,2	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	-0,2	7	0,4	ns	11	0,2	7	-0,1	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	2	NA	3	NA	NA	3	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	-0,4	5	0,0	ns	9	-0,6	6	-0,2	ns

Estímulo com K562BLOQ (intensidade de expressão, MFI)										
Subpopulações	PROLIFERATIVA IL-10					SECRETORA IL-10				
	EDT		CTR			EDT		CTR		p
	(n)	med	(n)	med	p	(n)	med	(n)	med	
NK totais	5	-16	7	16	ns	12	0	7	24	ns
CD56 <sup>dim</sup>	6	-7	7	15	ns	12	3	7	27	ns
Cd56 <sup>bright</sup>	4	-19	6	17	ns	9	-12	7	-0,6	ns
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>+</sup>	6	0	6	0	ns	11	3	7	0	0
CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>-</sup>	6	-6	7	<b>5</b>	<b>0,0385</b>	11	-6	7	-12	ns
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	2	NA	3	NA	NA	3	NA	3	NA	NA
CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup>	4	-12	5	-13	ns	9	-14	6	-4	ns

EDT: grupo endometriose; CTR: grupo controle; NK totais: incluem as subpopulações CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>; Proliferativa: fase proliferativa do ciclo menstrual (1<sup>o</sup> ao 14<sup>o</sup> dia do ciclo); Secretora: fase secretora do ciclo menstrual (15<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do ciclo); MFI: mediana de intensidade de fluorescência (intensidade de expressão); estímulo com K562BLOQ: estímulo com células K562 bloqueadas para a proteína MICA – valores descontado o valor basal (sem estímulo); valores negativos: valores onde o valor basal foi maior do que com estímulo; med: mediana; ns: valores de  $p$  não significantes ( $p \geq 0,05$ ); em negrito, valores de  $p$  significantes ( $p < 0,05$ ); em vermelho: valor de maior mediana na comparação entre os grupos analisados; n: número de amostras analisadas para cada subpopulação de células NK; NA: amostras não analisadas ( $< 100$  eventos na aquisição do citômetro); valores de  $p$  determinados pelo teste de *Mann-Whitney*.

**Tabela 13.** Frequência e intensidade de expressão de MICA nas células K562 e células K562 bloqueadas para MICA, e a análise da efetividade do bloqueio, utilizadas nos ensaios de citotoxicidade de células NK.

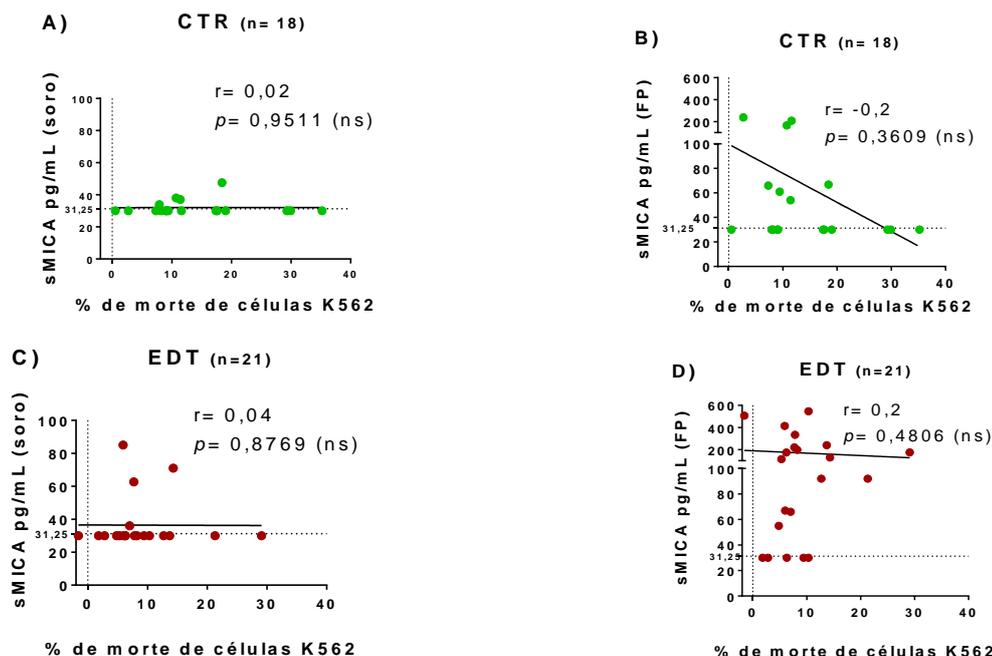
Experimento	K562*CFSE			K562*CFSEBLOQ			Efetividade do bloqueio para MICA	
	Células Vivas	MICA		Células Vivas	MICA		expressão (%)	MFI (%)
		%	expressão (%)		MFI	%		
1	84,7	38,8	1914	92,8	25,4	1487	34,5	22,3
2	74,6	67,4	2679	80,2	30,8	1806	54,3	32,6
3	92,7	78,0	2293	91,8	68,2	1559	12,6	32,0
4	91,0	80,2	2181	92,6	75,2	1723	6,2	20,9
5	94,0	51,5	1537	95,7	28,8	1036	44,1	32,6
6	96,2	39,7	964	93,5	22,5	734	43,0	23,9
7	95,4	21,7	406	96,7	13,1	125	39,6	69,2
8	91,7	81,7	2024	92,3	49,2	1114	39,8	44,9
9	85,3	40,1	742	77,9	16,1	265	59,9	64,1
<b>Mediana</b>	<b>91,7</b>	<b>51,5</b>	<b>1914</b>	<b>92,6</b>	<b>28,8</b>	<b>1114</b>	<b>39,8</b>	<b>32,6</b>
(min-max)	(84,7-96,2)	(21,7-81,7)	(742-2679)	(77,9-96,7)	(13,1-75,2)	(125-1806)	(6,2-59,9)	(22,3-69,2)

MFI: mediana de intensidade de fluorescência; K562\*CFSE: células K562 marcadas com o corante fluorescente CFSE; K562\*CFSEBLOQ: células K562 marcadas com CFSE e bloqueadas para a molécula MICA; CFSE: do inglês *-Carboxyfluorescein succinimidyl ester*; min: valor mínimo da mediana; max: valor máximo da mediana; a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o marcador LIVE/DEAD™ FixableAqua (descrito em Métodos, item 3.9.1).

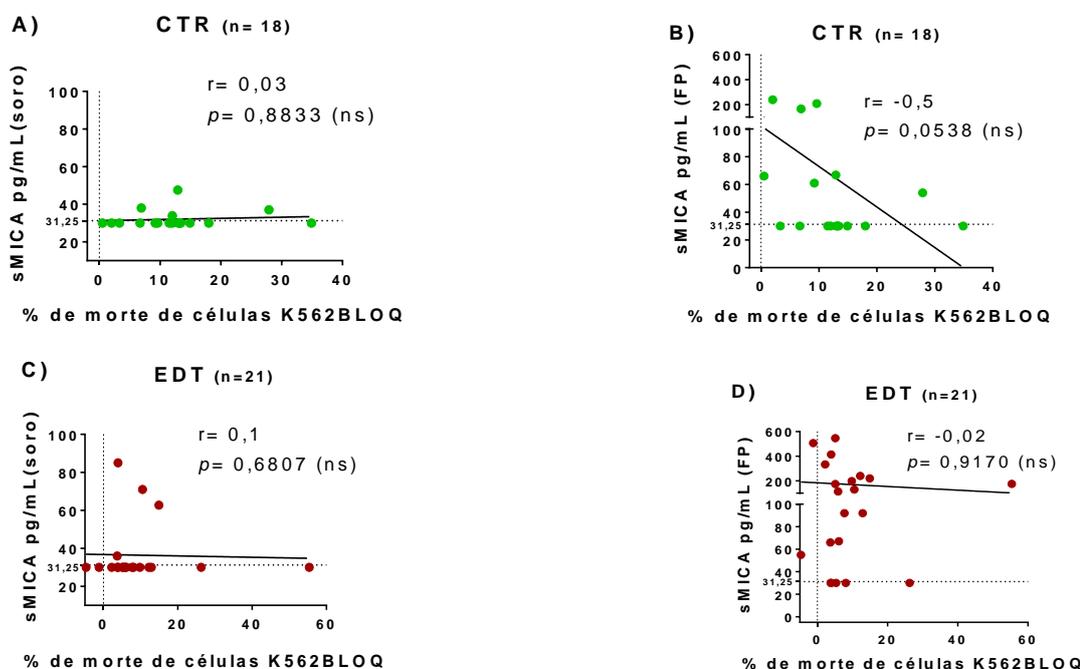
**Tabela 14.** Citotoxicidade de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles contra células K562 e células K562 bloqueadas para a proteína MICA, e porcentagens de bloqueio de MICA em células K562 usadas, para cada amostra.

CTR	% bloqueio para MICA em K562	% CTX		EDT	% bloqueio para MICA em K562	% CTX	
		K562	K562BLOQ			K562	K562BLOQ
C27	44,1	19,0	11,5	P054	39,6	14,3	10,5
C28	43,0	8,2	6,7	P055	39,8	5,3	5,9
C29	NT	7,3	0,5	P059	12,6	6,2	5,1
C30	6,2	11,6	9,6	P066	54,3	9,4	8,1
C32	54,3	9,0	18,0	P069	6,2	7,8	2,2
C33	34,5	11,4	27,9	P071	44,1	21,3	12,9
C35	6,2	10,7	6,9	P077	6,2	10,3	3,9
C38	12,6	2,7	2,0	P090	NT	-1,6	-1,2
C39	NT	0,5	13,2	P091	43,0	13,7	12,2
C42	44,1	35,2	12,0	P118	12,6	5,9	3,9
C43	44,1	29,9	13,0	P128	NT	4,8	-4,7
C44	44,1	29,3	14,9	P132	NT	6,3	26,3
C66	44,1	9,4	9,2	P137	12,6	7,0	3,7
C72	43,0	7,9	12,0	P139	40,0	8,2	9,8
C73	59,9	18,4	12,9	P140	39,6	12,7	7,7
C76	59,9	9,1	3,3	P141	39,8	6,0	6,1
C77	43,0	25,0	27,7	P145	6,2	10,3	5,1
C78	NT	17,6	13,4	P146	34,5	29,1	55,4
C79	NT	15,5	18,0	P147	39,8	2,8	5,3
C80	59,9	17,4	34,9	P148	39,8	1,8	3,8
C80	59,9	17,4	34,9	P155	54,3	7,7	14,9
<b>Mediana</b>	<b>44,1</b>	<b>11,5</b>	<b>12,5</b>	<b>Mediana</b>	<b>39,7</b>	<b>7,7</b>	<b>5,9</b>
(min-max)	(6,2-59,9)	(0,5-35,2)	(0,5-34,9)	(min-max)	(6,2-55,3)	(-1,6-29,1)	(-4,7-55,4)

CTR: grupo controle com numeração dos diferentes participantes da pesquisa; EDT: grupo endometriose com numeração dos diferentes participantes da pesquisa; CTX: citotoxicidade; % CTX: porcentagem de citotoxicidade avaliada pela porcentagem de morte de células K562 em ensaio de cocultura; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para a proteína MICA; valores de CTX contra K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; NT: não testado; min: valor mínimo; max: valor máximo.



**Figura 1. Análise de correlação entre a citotoxicidade de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles contra células K562 e níveis de MICA solúvel.** EDT: grupo controle; CTR: grupo controle; FP: fluido peritoneal; sMICA: MICA solúvel; linha pontilhada: valor limite de corte para a detecção de sMICA; níveis de sMICA determinados por ELISA; valores de CTX contra K562 descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada no eixo X: valor zero de % de células mortas; linha pontilhada no eixo Y: valor limite de corte para a detecção de sMICA (31,25pg/mL); níveis de sMICA determinados por ELISA; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de correção de Spearman.



**Figura 2. Análise de correlação entre a citotoxicidade de células NK circulantes de mulheres com endometriose e controles, contra células K562 bloqueadas para a proteína MICA, e níveis de MICA solúvel.** EDT: grupo controle; CTR: grupo controle; FP: fluido peritoneal; sMICA: MICA solúvel; K562BLOQ: K562 bloqueadas para MICA; valores de CTX contra K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores negativos: valores onde o valor de morte espontânea foi maior do que com estímulo; linha pontilhada no eixo X: valor zero de % de células mortas; linha pontilhada no eixo Y: valor limite de corte para a detecção de sMICA (31,25pg/mL); níveis de sMICA determinados por ELISA; ns: valor de  $p$  não significativo ( $p \geq 0,05$ ); valores de  $p$  determinados pelo teste de correção de Spearman.

**Tabela 15.** Análise de correlação entre a citotoxicidade de células NK circulantes frente a células K562 e células K562 bloqueadas para MICA e os níveis de MICA solúvel (soro e fluido peritoneal) em mulheres com endometriose, de acordo com o estágio da doença.

CTX K562							
I/II (n=9)				III/IV (n=12)			
sMICA soro		sMICA FP		sMICA soro		sMICA FP	
r	p	r	p	r	p	r	p
-0,3	0,6670	0,4	0,2712	0,3	0,3561	0,1	0,8857

CTX K562BLOQ							
I/II (n=9)				III/IV (n=12)			
sMICA soro		sMICA FP		sMICA soro		sMICA FP	
r	p	r	p	r	p	r	p
-0,2	0,7778	0,2	0,4599	0,2	0,5515	-0,3	0,4398

CTX: citotoxicidade; sMICA: MICA solúvel; FP: fluido peritoneal; I/II: estádios iniciais da endometriose; III/IV: estádios avançados da endometriose; estádios de acordo com a rASRM; K562BLOQ: células K562 bloqueadas para MICA; análise baseada nos valores de CTX contra K562 e K562BLOQ descontado o valor de morte espontânea de K562; valores de r e p determinados pelo teste de correlação de *Spearman*.

## **REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A B. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1974;4(3):269–74.
- Abrão MS, Podgaec S, Ribeiro S MJ. Tratamento cirúrgico da endometriose: quando e como fazer. In: MS A, editor. *Endometriose: uma visão contemporânea*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 137–47.
- Abrao MS, Andres MP, Miller CE, Gingold JA, Rius M, Neto JS, et al. AAGL 2021 Endometriosis Classification: An Anatomy-based Surgical Complexity Score. *J Minim Invasive Gynecol* [Internet]. 2021;28(11):1941-1950.e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2021.09.709>
- Abrao MS, Goncalves MO d. C, Dias JA, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* [Internet]. 2007 Oct 18;22(12):3092–7. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dem187>
- Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynecol Obstet*. 2003;82(1):31–40.
- Abrão MS, Petraglia F, Falcone T, Keckstein J, Osuga Y, Chapron C. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: Critical factors to consider before management. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):329–39.
- Adurthi S, Kumar MM, Vinodkumar HS, Mukherjee G, Krishnamurthy H, Acharya KK, et al. Oestrogen Receptor- $\alpha$  binds the FOXP3 promoter and modulates regulatory T-cell function in human cervical cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17102-w>
- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2008 Aug;10(8):1375–404. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2007.1964>
- Ahn SH, Monsanto SP, Miller C, Singh SS, Thomas R, Tayade C. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
- Akoum A, Lemay A, McColl S, Turcot-Lemay L, Maheux R. Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemoattractant protein-1 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 1996 Jul;66(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752605>
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* [Internet]. 2009;254(2):149–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.08.007>
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1–2):15–22.
- De Andrade LF, En Tay R, Pan D, Luoma AM, Ito Y, Badrinath S, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* (80- ). 2018;359(6383):1537–42.
- Andres MP, Borrelli GM, Abrão MS. Endometriosis classification according to pain symptoms: can the ASRM classification be improved? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2018;51:111–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.06.003>
- Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetync S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* [Internet]. 2006/08/10. 2006;25(2):331–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901727>
- Antsiferova YS, Sotnikova NY, Posiseeva L V., Shor AL. Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;84(6):1705–11.
- Aoki M. ENDOMETRIOSIS OF THE PELVIC LYMPH NODES. *Pathol Int* [Internet]. 1967 May;17(2):217–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1827.1967.tb03169.x>
- Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*. 2008;8:1–10.
- Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4 + CD25 + and FOXP3 + Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Implications for Human Reproduction . *J Immunol*. 2007;178(4):2572–8.
- Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem J*. 2013;454(2):295–302.
- Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: Translational aspects. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):49–56.

- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis1. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2000 Aug 1;85(8):2897–902. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/85/8/2897/2853885>
- Van Audenaerde JRM, De Waele J, Marcq E, Van Loenhout J, Lion E, Van den Bergh JMJ, et al. Interleukin-15 stimulates natural killer cell-mediated killing of both human pancreatic cancer and stellate cells. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 22;8(34):56968–79. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18185>
- Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* [Internet]. 2000;76:1–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079097>
- Banu SK, Lee J, Speights VO, Starzinski-Powitz A, Arosh JA. Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration, and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms. *Endocrinology*. 2008;149(3):1180–9.
- Barbieri RL. Stenosis of the external cervical os: An association with endometriosis in women with chronic pelvic pain. *Fertil Steril*. 1998;70(3):571–3.
- Bargostavan MH, Eslami G, Esfandiari N SSA. MMP9 Promoter Polymorphism (-1562 C/T) Does not Affect the Serum Levels of Soluble MICB and MICA in Breast Cancer. *Iran J Immunol*. 2016;13(1):45–53.
- Basu S, Pioli PA, Conejo-Garcia J, Wira CR, Sentman CL. Estradiol regulates MICA expression in human endometrial cells. *Clin Immunol* [Internet]. 2008 Nov;129(2):325–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661608007146>
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* (80- ). 1999;285(5428):727–9.
- Becker CM, Laufer MR, Stratton P, Hummelshoj L, Missmer SA, Zondervan KT, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 Nov;102(5):1213–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028214013363>
- Becker CM, Louis G, Exarhopoulos A, Mechsner S, Ebert AD, Zurakowski D, et al. Matrix metalloproteinases are elevated in the urine of patients with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;94(6):2343–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.02.040>
- Bellelis P, Frediani Barbeiro D, Gueuvoghlian-Silva BY, Kalil J, Abrão MS, Podgaec S. Interleukin-15 and Interleukin-7 are the Major Cytokines to Maintain Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2019;84(5):435–44.
- Berbic M, Fraser IS. Immunology of normal and abnormal menstruation. *Women's Heal*. 2013;9(4):387–95.
- Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C, Tokushige N, Ganewatta S, Markham R, et al. The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis: a potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 Apr 1;25(4):900–7. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deq020>
- Berbic M, Schulke L, Markham R, Tokushige N, Russell P, Fraser IS. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* [Internet]. 2009 Feb 1;24(2):325–32. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/den393>
- Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The Pains of Endometriosis. *Science* (80- ) [Internet]. 2005 Jun 10;308(5728):1587–9. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1111445>
- Borghese B, Zondervan KT, Abrao MS, Chapron C, Vaiman D. Recent insights on the genetics and epigenetics of endometriosis. *Clin Genet*. 2017;91(2):254–64.
- Borrelli G. Avaliação de fatores associados à invasão, migração celular e transformação maligna em mulheres com endometriose profunda. 2015.
- Borrelli GM, Abrão MS, Taube ET, Darb-Esfahani S, Köhler C, Kaufmann AM, et al. Immunohistochemical Investigation of Metastasis-Related Chemokines in Deep-Infiltrating Endometriosis and Compromised Pelvic Sentinel Lymph Nodes. *Reprod Sci*. 2015;22(12):1632–42.
- Boukouaci W, Al-Daccak R, Dulphy N, Lauden L, Amokrane K, Fortier C, et al. Soluble MICA-NKG2D interaction upregulates IFN- $\gamma$  production by activated CD3-CD56+ NK cells: Potential impact on chronic graft versus host disease. *Hum Immunol* [Internet]. 2013;74(12):1536–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.08.281>
- Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. 2006;132(3):501–9.
- Brosens I, Brosens JJ, Benagiano G. The eutopic endometrium in endometriosis: Are the changes of clinical significance? *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2012;24(5):496–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.022>
- Brosens J BI. Adenomyosis. In: Cameron I, Fraser I SS, editor. *Clinical Disorders of the Menstrual Cycle and Endometrium*. New York: Oxford University Press; 1998. p. 297–312.

- Bruner-Tran KL, Mokshagundam S, Herington JL, Ding T, Osteen KG. Rodent Models of Experimental Endometriosis: Identifying Mechanisms of Disease and Therapeutic Targets. *Curr Women s Heal Rev*. 2018;14(2):173–88.
- Bulun SE, Cheng Y, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, et al. Progesterone resistance in endometriosis : Link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;248:94–103.
- Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, et al. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;79(1–5):19–25.
- Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril [Internet]*. 2012;98(3):511–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>
- Burney RO, Talbi S, Hamilton AE, Kim CV, Nyegaard M, Nezhat CR, et al. Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. *Endocrinology*. 2007;148(8):3814–26.
- Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, et al. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol*. 2007;19(3):287–96.
- CakmakH, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA AA. Immune-endocrine interactions in endometriosis. *Front Biosci*. 2009;1:429–43.
- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461–9.
- Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, et al. Unique Subpopulations of CD56 + NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire . *J Immunol*. 2001;166(11):6477–82.
- Canis M, Donnez JG, Guzick DS, Halme JK, Rock JA, Schenken RS, et al. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817–21.
- Cannistra SA. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med [Internet]*. 2004 Dec 9;351(24):2519–29. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra041842>
- Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev*. 2015;267(1):88–116.
- Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ [Internet]*. 2014;21(1):5–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.26>
- Chang K-K, Liu L-B, Jin L-P, Zhang B, Mei J, Li H, et al. IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR $\gamma$ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2017 [cited 2022 Jan 2];8. Available from: [www.nature.com/cddis](http://www.nature.com/cddis)
- Chapron C, Dubuisson JB, Fritel X, Fernandez B, Poncelet C, Béguin S, et al. Operative management of deep endometriosis infiltrating the uterosacral ligaments. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 1999;6(1):31–7.
- Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, Barakat H, Dousset B, Pansini V, et al. Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: Surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod*. 2003;18(1):157–61.
- Chegini N, Roberts M, Ripps B. Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *Am J Reprod Immunol*. 2003;49(2):75–83.
- Chuang PC, Wu MH, Shoji Y TS. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J Pathol*. 2009;219(2):232–41.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *J Immunol*. 2008;180(11):7249–58.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001a;22(11):633–40.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood [Internet]*. 2001b May 15;97(10):3146–51. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/97/10/3146/89683/Human-natural-killer-cells-a-unique-innate>
- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril [Internet]*. 1990;53(6):978–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2140994>
- Cox ST, Laza-Briviesca R, Pearson H, Soria B, Gibson D, Gomez S, et al. Umbilical cord blood plasma contains soluble NKG2D ligands that mediate loss of natural killer cell function and cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2015;45(8):2324–34.
- Critchley HOD, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT. The endocrinology of menstruation - A role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(6):701–10.
- Crona Guterstam Y, Strunz B, Ivarsson MA, Zimmer C, Melin AS, Jonasson AF, et al. The cytokine profile of menstrual blood. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021;100(2):339–46.
- Cruz C Dela, Reis FM. The role of TGF  $\beta$  superfamily members in the pathophysiology of endometriosis. *Gynecol Endocrinol [Internet]*. 2015;31(7):511–5. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.3109/09513590.2015.1018166>
- Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* [Internet]. 1993 Aug;133(2):829–37. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.133.2.8344219>
- D'Hooghe TM, Xiao L, Hill JA. Cytokine profiles in autologous peritoneal fluid and peripheral blood of women with deep and superficial endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2001;265(1):40–4.
- Deng L, Shipley GL, Loose-Mitchell DS, Stancel GM, Broaddus R, Pickar JH, et al. Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2157–63.
- Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN- $\gamma$ -secreting and IFN- $\gamma$ -nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):879–84.
- Deniz G, Erten G, K $\ddot{u}$ c $\ddot{u}$ ksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, et al. Regulatory NK Cells Suppress Antigen-Specific T Cell Responses. *J Immunol*. 2008;180(2):850–7.
- Dias JA, Podgaec S, de Oliveira RM, Carnevale Marin ML, Baracat EC, Abr $\tilde{a}$ o MS. Patients With Endometriosis of the Rectosigmoid Have a Higher Percentage of Natural Killer Cells in Peripheral Blood. *J Minim Invasive Gynecol*. 2012;19(3):317–24.
- Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MYB, Raulet DH. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):381–91.
- Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*. 2001;181(7):170–84.
- Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AA, Hsia JK, Vivier E, et al. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1142–9.
- Dmowski WP, Braun D GH. Endometriosis: genetic and immunologic aspects. *Prog Clin Biol Res*. 1990;323:99–122.
- Dmowski WP, Braun DP. Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(2):245–63.
- Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1802–8.
- Dogra P, Rancan C, Ma W, Toth M, Senda T, Carpenter DJ, et al. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell* [Internet]. 2020;180(4):749-763.e13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.022>
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*. 1998;13(6):1686–90.
- Dosiou C, Lathi RB, Tulac S, Huang STJ, Giudice LC. Interferon-related and other immune genes are downregulated in peripheral blood leukocytes in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2501–4.
- Dubernard G, Piketty M, Rouzier R, Houry S, Bazot M, Darai E. Quality of life after laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Hum Reprod*. 2006;21(5):1243–7.
- Eisermann J, Gast MJ, Pineda J, Odem RR, Collins JL. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery. *Fertil Steril* [Internet]. 1988;50(4):573–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60185-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60185-1)
- Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood*. 2007;109(11):4816–24.
- Estes PA, Suba EJ, Lawler-Heavner J, El-Ashry-Stowers D, Wei LL, Toft DO, et al. Immunologic analysis of human breast cancer progesterone receptors. 1. Immunoaffinity purification of transformed receptors and production of monoclonal antibodies. *Biochemistry* [Internet]. 1987 Sep 22;26(19):6250–62. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00393a045>
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167–76.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. 2001 Sep 15;108(6):785–91. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/14006>
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: A potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052–7.
- Ferlazzo G, M $\ddot{u}$ nz C. NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *J Immunol*. 2004;172(3):1333–9.
- Ferrari de Andrade L, Tay RE, Pan D, Luoma AM, Ito Y, Badrinath S, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science (80- )* [Internet]. 2018 Mar 30;359(6383):1537–42. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao0505>

- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2006 Apr;27(2–3):126–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000944>
- Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O’Herlihy C, O’Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol*. 2000;43(4):209–17.
- Fox HS, Bond BL, Parslow TG. Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* [Internet]. 1991 Jun 15;146(12):4362–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904081>
- Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214(1):56–72.
- Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* [Internet]. 2017;47(5):820–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>
- Fuertes MB, Domaica CI, Zwirner NW. Leveraging NKG2D Ligands in Immuno-Oncology. *Front Immunol*. 2021;12(July):1–27.
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y, Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* [Internet]. 1988;263(34):18545–52. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81393-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81393-5)
- Gaide Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriët P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2012;1824(1):146–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.09.003>
- Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O’Brien SJ, Carrington M. Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations. *Hum Immunol*. 2006;67(3):152–8.
- Garrity D, Call ME, Feng J, Wucherpfennig KW. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(21):7641–6.
- Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M, Muzzioli M, Stefano G Di, Fabris N. Natural killer activity in stage III and IV endometriosis: Impaired cytotoxicity and retained lymphokine responsiveness of natural killer cells. *Gynecol Endocrinol*. 1995;9(2):125–30.
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436(7054):1186–90.
- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med*. 2007;25(6):445–53.
- Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer* [Internet]. 2017;116(9):1208–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.79>
- Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1516–22.
- Giudice LC. Endometriosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jun 24;362(25):2389–98. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp1000274>
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* [Internet]. 2004;364(9447):1789–99. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453>
- Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E FJ. Is endometriosis an autoimmune disease? *Obs Gynecol*. 1987;70:115–22.
- Gmyrek GB, Sieradzka U, Goluda M, Gabryś M, Sozański R, Jerzak M, et al. Differential flow cytometric detection of intracellular cytokines in peripheral and peritoneal mononuclear cells of women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;137(1):67–76.
- González-Foruria I, Santulli P, Chouzenoux S, Carmona F, Batteux F, Chapron C. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during endometriosis and correlate with disease severity. *PLoS One* [Internet]. 2015/03/16. 2015;10(3):e0119961. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775242>
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12445–50.
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cell by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255–60.
- Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(7):755–62.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734–8.
- Gross E, Sunwoo JB, Bui JD. Cancer immunosurveillance and immunoediting by natural killer cells.

- Cancer J (United States). 2013;19(6):483–9.
- Guo SW, Du Y, Liu X. Platelet-derived TGF- $\beta$ 1 mediates the down-modulation of NKG2D expression and may be responsible for impaired natural killer (NK) cytotoxicity in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1462–74.
- Hafner LM, Cunningham K, Beagley KW. Ovarian steroid hormones: Effects on immune responses and Chlamydia trachomatis infections of the female genital tract. *Mucosal Immunol*. 2013;6(5):859–75.
- Halme J, Becker S, Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1984;148(1):85–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(84\)80037-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(84)80037-X)
- Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, et al. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;176(3):593–7.
- Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS One*. 2011;6(2).
- Heidemann LN, Hartwell D, Heidemann CH, Jochumsen KM. The relation between endometriosis and ovarian cancer - A review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2014;93(1):20–31.
- Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA, Osteen KG. Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(5):611–26.
- Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, Saki M, Siozaki A, Miwa N, et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(1):21–9.
- Hill JA, Faris HMP, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1988;50(2).
- Hirata J, Kikuchi Y, Imaizumi E, Tode T, Nagata I. Endometriotic tissues produce immunosuppressive factors. *Gynecol Obstet Invest*. 1994;37(1):43–7.
- Ho HN, Chao KH, Chen HF, Wu MY, Yang YS, Lee TY. Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. *Hum Reprod*. 1995;10(10):2671–5.
- Hobbs JE, Bortnick AR. Endometriosis of the Lungs. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1940;40(5):832–43. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(15\)30807-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(15)30807-3)
- Imamura T, Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Ishimaru T, et al. 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* [Internet]. 2014;180(1):16–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.06.002>
- Isernhagen A, Malzahn D, Bickeböller H, Dressel R. Impact of the MICA-129Met/val dimorphism on NKG2D-mediated biological functions and disease risks. *Front Immunol*. 2016;7(DEC):1–9.
- Isernhagen A, Malzahn D, Viktorova E, Elsner L, Monecke S, Bonin F, et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med*. 2015;7(11):1480–502.
- Iwasaki, K. I; Makino, T.; Maruyama, T.; Matsubayashi, H.; Nozawa, S.; Yokokura T. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *Int J Fertil* (1993), 38(4). 1993;38(4):229–34.
- Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HOD. Endocrine regulation of menstruation. *Endocr Rev*. 2006;27(1):17–46.
- Jaeger-Lansky A, Schmidthaler K, Kuessel L, Gstöttner M, Waidhofer-Söllner P, Zlabinger GJ, et al. Local and systemic levels of cytokines and danger signals in endometriosis-affected women. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2018;130(July):7–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.07.006>
- Jiang J, Jiang Z, Xue M. Serum and peritoneal fluid levels of interleukin-6 and interleukin-37 as biomarkers for endometriosis. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2019;35(7):571–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1554034>
- Jiang W, Chai NR, Maric D, Bielekova B. Unexpected Role for Granzyme K in CD56 bright NK Cell-Mediated Immunoregulation of Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2011;187(2):781–90.
- Jiang Y, Chen L, Taylor RN, Li C, Zhou X. Physiological and pathological implications of retinoid action in the endometrium. *J Endocrinol*. 2018;236(3):R169–88.
- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, et al. Autocrine/Paracrine IL-15 That Is Required for Type I IFN-Mediated Dendritic Cell Expression of MHC Class I-Related Chain A and B Is Impaired in Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2003;171(10):5423–9.
- Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1285–90.
- Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 1998;13(12):3496–502.
- Kamergorodsky G, Ribeiro PAA, Galvão MAL, Abrão MS, Donadio N, de Barros Moreira Lemos NL, et

- al. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril*. 2009;92(6):2074–7.
- Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T. Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(1):257–61.
- Karpuzoglu-Sahin E, Hissong BD, Ansar Ahmed S. Interferon- $\gamma$  levels are upregulated by 17- $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol. *J Reprod Immunol*. 2001;52(1–2):113–27.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675–8.
- Kats R, Collette T, Metz CN, Akoum A. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;78(1):69–76.
- Kayisli OG, Kayisli UA, Luleci G, Arici A. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biol Reprod*. 2004;71(3):714–21.
- Ke J, Ye J, Li M, Zhu Z. The role of matrix metalloproteinases in endometriosis: A potential target. *Biomolecules*. 2021;11(11):1–16.
- Kelly RW, King AE, Crithley HOD. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*. 2001;121(1):3–19.
- Kimura MY, Nakayama T. Differentiation of NK1 and NK2 cells. Vol. 25, *Critical Reviews in Immunology*. 2005.
- King A, Gardner L, Loke YW. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Hum Reprod*. 1996;11(5):1079–82.
- Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;83(1–5):149–55.
- Klemmt PAB, Carver JG, Koninckx P, McVeigh EJ, Mardon HJ. Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: Towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum Reprod*. 2007;22(12):3139–47.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(14):2905–19.
- Klöß S, Chambron N, Gardlowski T, Arseniev L, Koch J, Esser R, et al. Increased sMICA and TGF $\beta$ 1 levels in HNSCC patients impair NKG2D-dependent functionality of activated NK cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(11).
- Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* [Internet]. 1991;55(4):759–65. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54244-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54244-7)
- Kovats S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cell Immunol*. 2015;29(2):63–9.
- Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* [Internet]. 2005 Jul;157(3):175–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427405000883>
- Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, et al. Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. Villa E, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 14;7(9):e44743. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044743>
- Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, Hooghe TMD. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;9:1–9.
- Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, et al. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 2008 Feb;89(2):301–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028207005250>
- Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol*. 2004;113(3):224–30.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:359–93.
- Laškarin G, Tokmadži VS, Štrbo N, Bogovi T, Szekeres-Bartho J, Randi L, et al. Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. *Am J Reprod Immunol*. 2002;48(4):201–9.
- Lavini-Ramos C, Silva HM, Soares-Schanoski A, Monteiro SM, Ferreira LRP, Pacanaro AP, et al. MMP9 integrates multiple immunoregulatory pathways that discriminate high suppressive activity of human mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–15.
- Lee SK, Kim CJ, Kim D-J, Kang J. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. *Immune Netw*. 2015;15(1):16.
- Liu DTY, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1986;93(8):859–62.
- Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. Cutting Edge: The Membrane Type Matrix Metalloproteinase MMP14 Mediates Constitutive Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule

- A Independent of A Disintegrin and Metalloproteinases. *J Immunol.* 2010;184(7):3346–50.
- Liu H, Lang JH. Is abnormal ectopic endometrium the cause of endometriosis? The role of eutopic endometrium in pathogenesis of endometriosis. *Med Sci Monit.* 2011;17(4):92–9.
- Liu K, Zhang W, Liu S, Dong B, Liu Y. Hepatic endometriosis: a rare case and review of the literature. *Eur J Med Res [Internet].* 2015 Dec 4;20(1):48. Available from: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-015-0137-1>
- Liu Q, Ma P, Liu L, Ma G, Ma J, Liu X, et al. Evaluation of PLGA containing anti-CTLA4 inhibited endometriosis progression by regulating CD4 + CD25 + Treg cells in peritoneal fluid of mouse endometriosis model. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 2017;96:542–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.031>
- Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today [Internet].* 1990;11(7):237–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201309>
- Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(4):391–8.
- Lopes B, Ramos IC, Ribeiro G, Correa R, Valbon B; Luz A, Salomão M, Lyra JM AJR. Biostatistics: fundamental concepts and practical applications *Bioestatísticas: conceitos fundamentais e aplicações práticas.* *Rev Bras Oftalmol.* 2014;73(1):16–22.
- Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* 2010;116(19):3865–74.
- Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 1977;19(1):136.
- Lubis HP, Aldiansyah D, Siregar HS, Rivany R, Hariadi TS. Expression of natural killer cell activity with CD107a on ectopic endometrium in woman with endometriosis compared with non-endometriosis. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2018;125(1).
- Luo Q, Luo W, Zhu Q, Huang H, Peng H, Liu R, et al. Tumor-derived soluble MICA obstructs the NKG2D pathway to restrain NK cytotoxicity. *Aging Dis.* 2020;11(1):118–28.
- Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T, Fukaya T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril [Internet].* 2002;77(2):297–302. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821086>
- Manaster I, Mandelboim O. The Unique Properties of Human NK Cells in the Uterine Mucosa. *Placenta.* 2008;29(SUPPL.):60–6.
- Mansour I, Reznikoff-etievant MF, Netter A. No evidence for the expression of the progesterone receptor on peripheral blood lymphocytes during pregnancy. *Hum Reprod.* 1994;9(8):1546–9.
- Marbaix E. [Role of matrix metalloproteinases in the endometrium in normal and pathologic menstruation]. *Bull Mem Acad R Med Belg [Internet].* 2005;160(5–6):232–8; discussion 239-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16465777>
- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(17):9120–5.
- Marcenaro S, Gallo F, Martini S, Santoro A, Griffiths GM, Aricó M, et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): Defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood.* 2006;108(7):2316–23.
- De Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P, et al. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. *Eur J Immunol [Internet].* 2007 Feb;37(2):445–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200635989>
- Marin MLC, Coelho V, Visentainer JEL, Alves HV, Köhler KF, Rached MR, et al. Inhibitory KIR2DL2 Gene: Risk for Deep Endometriosis in Euro-descendants. *Reprod Sci.* 2021;28(1):291–304.
- Marin MLC, Savioli CR, Yamamoto JH, Kalil J, Goldberg AC. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. *Eur J Immunogenet.* 2004;31(2):63–71.
- Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, Kaye PM. Posttranscriptional Regulation of Il10 Gene Expression Allows Natural Killer Cells to Express Immunoregulatory Function. *Immunity.* 2008;29(2):295–305.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for TH1 priming. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1260–5.
- Martin-Pagola A, Ortiz L, De Nancrales GP, Vitoria JC, Castaño L, Bilbao JR. Analysis of the Expression of MICA in Small Intestinal Mucosa of Patients with Celiac Disease. *J Clin Immunol [Internet].* 2003 Nov;23(6):498–503. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:JOCI.0000010426.16956.cc>
- Matarese G, De Placido G, Nikas Y, Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: Natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med.* 2003;9(5):223–8.
- Mathur S, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin (Ig)G, IgA, and IgM

- responses in endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 1990 Jul;54(1):56–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2358092>
- Matsuoka S, Maeda N, Izumiya C, Yamashita C, Nishimori Y, Fukaya T. Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2005;53(5):249–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833103>
- Matusali G, Tchidjou HK, Pontrelli G, Bernardi S, D'Ettoire G, Vullo V, et al. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J*. 2013;27(6):2440–50.
- Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: Implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):748–61.
- McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: Interactions between nuclear factor- $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*. 1999;20(4):435–59.
- Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol*. 2002;10(2–3):147–64.
- Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Malspeis S, Willett WC, et al. Reproductive History and Endometriosis Among Premenopausal Women. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2004 Nov;104(5, Part 1):965–74. Available from: <http://journals.lww.com/00006250-200411000-00013>
- Mollenhauer HH, James Morr e D, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *BBA - Rev Biomembr*. 1990;1031(2):225–46.
- Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Young SL, et al. Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril* [Internet]. 2016;105(4):968-977.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.047>
- Monsivais D, Dyson MT, Yin P, Coon JS, Navarro A, Feng G, et al. ER $\beta$ - and prostaglandin E2-regulated pathways integrate cell proliferation via Ras-like and estrogen-regulated growth inhibitor in endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2014;28(8):1304–15.
- Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol*. 2002;3(1):6–8.
- Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016;16(1):7–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Muharam R, Febri RR, Prabowo KA, Bustami A, Mansur IG. Increased Levels of CD107a and Intracellular Cytokines in IL-2 Stimulated PBMCs from Endometriosis Patients. Moshage HJ, editor. *Int J Inflam* [Internet]. 2021 Sep 27;2021:1–6. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijji/2021/5760959/>
- Nanda A, Thangapandi K, Banerjee P, Dutta M, Wangdi T, Sharma P, et al. Cytokines, angiogenesis, and extracellular matrix degradation are augmented by oxidative stress in endometriosis. *Ann Lab Med*. 2020;40(5):390–7.
- Nandakumar S, Miller CW, Kumaraguru U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clin Mol Allergy* [Internet]. 2009 Dec 12;7(1):5. Available from: <https://clinicalmolecularallergy.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-7961-7-5>
- Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene*. 2008;27(45):5944–58.
- Nishikiori N, Koyama M, Kikuchi T, Kimura T, Ozaki M, Harada S, et al. Membrane-Spanning Fc $\gamma$  Receptor III Isoform Expressed on Human Placental Trophoblasts. *Am J Reprod Immunol*. 1993;29(1):17–25.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 1993 Mar;59(3):681–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458479>
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* [Internet]. 1997;68(4):585–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341595>
- Notas G, Kampa M, Castanas E. G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Immune Cells and Its Role in Immune-Related Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11(October):1–9.
- Odukoya O, Bansal A, Cooke I. Serum endometrial IgG antibodies and soluble CD23 concentrations in patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75(10):927–31.
- 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* [Internet]. 1991;56(1):45–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065804>
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1993 Aug;82(2):206–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8336865>
- 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* [Internet]. 1992;58(2):290–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1633893>

- Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):713–25.
- Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):593–600.
- Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2003;21(2):155–63.
- Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(1):1–10.
- Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Distribution of heat shock proteins in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril [Internet]*. 1997;68(1):23–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81470-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81470-7)
- Ota H, Rong H, Igarashi S, Tanaka T. Suppression of natural killer cell activity by splenocyte transplantation in a rat model of endometriosis. *Hum Reprod*. 2002;17(6):1453–8.
- Otoyama Y, Arai J, Goto K, Nozawa H, Nakagawa R, Muroyama R, et al. Retinoids Decrease Soluble MICA Concentration by Inhibiting the Enzymatic Activity of ADAM9 and ADAM10. *Anticancer Res [Internet]*. 2021 May 5;41(5):2307–20. Available from: <http://ar.iijournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.15006>
- P M Baxendale, M J Reed VHJ. Inability of human endometrium or myometrium to aromatize androstenedione. *J Steroid Biochem*. 1981;14(3):305-6.
- Pardoll DM. Stress, NK Receptors, and Immune Surveillance. *Science (80- ) [Internet]*. 2001 Oct 19;294(5542):534–6. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1066284>
- Parker MG. Steroid and related receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(3):499–504.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood [Internet]*. 1989 Nov 15;74(7):2527–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2478233>
- Peraldi M-N, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, et al. Oxidative Stress Mediates a Reduced Expression of the. *J Immunol*. 2009;182(1):1696–705.
- Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, et al. Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet [Internet]*. 2002 Feb;29(1):35–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0960-7420.2001.00275.x>
- Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, Karp CL, et al. Systemic but Not Local Infections Elicit Immunosuppressive IL-10 Production by Natural Killer Cells. *Cell Host Microbe [Internet]*. 2009;6(6):503–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.003>
- Perussia B, Ravetch J V. FcγRIII (CD16) on human macrophages is a functional product of the FcγRIII-2 gene. *Eur J Immunol*. 1991;21(2):425–9.
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*. 1991;173(5):1099–109.
- Petri B, Sanz MJ. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res*. 2018;371(3):425–36.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2001 May 1;29(9):45e – 45. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pizzo A, Salmeri FM, Ardita F V., Sofo V, Tripepi M, Marsico S. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2002;54(2):82–7.
- Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Rizzo L V., de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: An inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373–9.
- Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM de, Baracat EC, Abrão MS. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(1):92–8.
- Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LFC, Baracat EC, Abrao MS. CD4+CD25highFoxp3+ Cells Increased in the Peritoneal Fluid of Patients with Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(4):301–8.
- Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology*. 2009;126(4):458–65.
- Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2019;105(6):1319–29.
- Pratt WB. Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol Cell Endocrinol [Internet]*. 1990 Nov;74(1):C69–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030372079090198H>
- Rached MR, Coelho V, Marin MLC, Pincerato K, Fujita A, Kalil JE, et al. HLA-G is upregulated in advanced endometriosis. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol [Internet]*. 2019/02/06. 2019;235:36–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30784825>
- Rae MT, Hillier SG. Steroid signalling in the ovarian surface epithelium. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(7):327–33.
- Rahmioglu N, Fassbender A, Vitonis AF, Tworoger SS, Hummelshoj L, D'Hooghe TM, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization

- Project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil Steril*. 2014;102(5):1233–43.
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):781–90.
- Reed BG, Carr BR. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation [Internet]. *Endotext*. 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905282>
- Reiss K, Ludwig A, Saftig P. Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):985–1006.
- Ren J, Nie Y, Lv M, Shen S, Tang R, Xu Y, et al. Estrogen upregulates MICA/B expression in human non-small cell lung cancer through the regulation of ADAM17. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(6):768–76.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(9):785–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* [Internet]. 1994 Sep 1;94(3):946–53. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/117461>
- Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* [Internet]. 2001 Nov 1;45(3):194–205. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3%3C194::AID-CYTO1163%3E3.0.CO;2-C](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0320(20011101)45:3%3C194::AID-CYTO1163%3E3.0.CO;2-C)
- Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 2013;121(18):3599–608.
- Russel WW. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: Ovarian cysts of müllerian origin. *Bull John Hopkins Hosp*. 1899;10:8–10.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(7):490–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2785>
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Aug;212(1):8–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x>
- Salamanca A, Beltran E. Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 1995;64(1):193–5.
- Salamonsen LA, Lathbury LJ. Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update*. 2000;6(1):16–27.
- Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: Induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol*. 1999;44(1–2):1–27.
- Salamonsen LA, Zhang J, Brasted M. Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod Immunol*. 2002;57(1–2):95–108.
- Salih HR, Rammensee H-G, Steinle A. Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J Immunol*. 2002;169(8):4098–102.
- Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* [Internet]. 1927a;3(2):93-110.43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1931779>
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1927b;14(4):422–69. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378\(15\)30003-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9378(15)30003-X)
- De Sanctis P, Elmakky A, Farina A, Caramelli E, Seracchioli R, Mabrouk M, et al. Matrix metalloproteinase-3 mRNA: A promising peripheral blood marker for diagnosis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;71(2):118–23.
- Schmiedel D, Mandelboim O. NKG2D ligands-critical targets for cancer immune escape and therapy. *Front Immunol*. 2018;9(SEP):1–10.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2004 Feb;75(2):163–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0603252>
- Schulke L, Berbic M, Manconi F, Tokushige N, Markham R, Fraser IS. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1695–703.
- Schulke L, Manconi F, Markham R, Fraser IS. Endometrial dendritic cell populations during the normal menstrual cycle. *Hum Reprod* [Internet]. 2008 Apr 18;23(7):1574–80. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/den030>

- Schwane V, Huynh-Tran VH, Vollmers S, Yakup VM, Sauter J, Schmidt AH, et al. Distinct Signatures in the Receptor Repertoire Discriminate CD56bright and CD56dim Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2020;11(December):1–13.
- Seeger P, Bosisio D, Parolini S, Badolato R, Gismondi A, Santoni A, et al. Activin A as a Mediator of NK–Dendritic Cell Functional Interactions. *J Immunol*. 2014;192(3):1241–8.
- Selvaraj P, Carpén O, Hibbs ML, Springer TA. Natural killer cell and granulocyte Fc gamma receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. *J Immunol [Internet]*. 1989 Nov 15;143(10):3283–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553809>
- Serdar E, Bulun MD. Mechanism of Disease Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;(360):268–79.
- Serrano AE, Menares-Castillo E, Garrido-Tapia M, Ribeiro CH, Hernández CJ, Mendoza-Naranjo A, et al. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):447–57.
- Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA, Arici A. Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2349–57.
- Shabrish S, Kelkar M, Chavan N, Desai M, Bargir U, Gupta M, et al. Natural killer cell degranulation defect: A cause for impaired NK-cell cytotoxicity and hyperinflammation in Fanconi anemia patients. *Front Immunol*. 2019;10(MAR):1–10.
- Sharpe-Timms KL. Endometrial Anomalies in Women with Endometriosis. *Ann N Y Acad Sci [Internet]*. 2001 Sep;943(1):131–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03797.x>
- Sheppard S, Ferry A, Guedes J, Guerra N. The Paradoxical Role of NKG2D in Cancer Immunity. *Front Immunol [Internet]*. 2018;9:1808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150983>
- Shin-ichi Komiyama, Daisuke Aoki, Mizuka Komiyama SN. Local activation of TGF-beta1 at endometriosis sites. *J Reprod Med*. 2007;52(4):306–12.
- Shiraishi K, Mimura K, Kua LF, Koh V, Siang LK, Nakajima S, et al. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. *J Gastroenterol*. 2016;51(12):1101–11.
- Sidell N, Han SW, Parthasarathy S. Regulation and modulation of abnormal immune responses in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:159–73.
- Siemaszko J, Marzec-przyszlak A, Bogunia-kubik K. Nkg2d natural killer cell receptor—a short description and potential clinical applications. *Cells*. 2021;10(6).
- Silberstein SD, Merriam GR. Physiology of the Menstrual Cycle. *Cephalalgia [Internet]*. 2000 Apr 17;20(3):148–54. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1046/j.1468-2982.2000.00034.x>
- Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HOD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum Reprod*. 1999;14(3):793–9.
- Solass W, Horvath P, Struller F, Königsrainer I, Beckert S, Königsrainer A, et al. Functional vascular anatomy of the peritoneum in health and disease. *Pleura and Peritoneum*. 2016;1(3):145–58.
- Somigliana E, Viganò P, Gaffuri B, Candiani M, Busacca M, Di Blasio AM, et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: Potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(5):295–300.
- Song H, Kim Y, Park G, Kim YS, Kim S, Lee HK, et al. Transforming growth factor-β1 regulates human renal proximal tubular epithelial cell susceptibility to natural killer cells via modulation of the NKG2D ligands. *Int J Mol Med [Internet]*. 2015 Oct;36(4):1180–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2015.2317>
- Spear P, Wu M-R, Sentman M-L, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immunol [Internet]*. 2013;13:8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23833565>
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001;53(4):279–87.
- Suen JL, Chang Y, Chiu PR, Hsieh TH, Hsi E, Chen YC, et al. 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 [Internet]*. 2014;184(2):464–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.10.023>
- Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int*. 2011;35(6):569–74.
- Suryawanshi S, Huang X, Elishaev E, Budiu RA, Zhang L, Kim S, et al. Complement Pathway Is Frequently Altered in Endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2014 Dec 1;20(23):6163–74. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1338>
- Swiersz LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;955:281–92.
- Symons LK, Miller JE, Kay VR, Marks RM, Liblik K, Koti M, et al. The Immunopathophysiology of

- Endometriosis. *Trends Mol Med* [Internet]. 2018;24(9):748–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.004>
- Szekeres-Bartho J, Philibert D, Chaouat G. Progesterone Suppression of Pregnancy Lymphocytes Is not Mediated by Glucocorticoid Effect. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 1990 Jun;23(2):42–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0897.1990.tb00668.x>
- Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F, et al. Expression and regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$  in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(2):382–90.
- 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.
- Tape TG. Interpreting diagnostic tests. <http://gim.unmc.edu/dxtests/Default.htm>. 2015.
- Tariverdian N, Siedentopf F, Rütke M, Blois SM, Klapp BF, Kentenich H, et al. Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2009;80:80–90.
- Tariverdian N, Theoharides TC, Blois SM, Arck PC. Neuroendocrine – immune disequilibrium and endometriosis : an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol*. 2007;193–210.
- Taylor P V, Maloney MD, Campbell JM, Skerrow SM, Nip MMC, Parmar R, et al. Autoreactivity in women with endometriosis. *Br J Obs Gynaecol*. 1991;98:680–4.
- Textor S, Dürst M, Jansen L, Accardi R, Tommasino M, Trunk MJ, et al. Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2008 Nov 15;123(10):2343–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23733>
- Teyssier C, Belguise K, Galtier F, Chabos D. Characterization of the Physical Interaction between Estrogen Receptor  $\alpha$  and JUN Proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Sep;276(39):36361–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192582086709X>
- Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C. Natural Killer Cells: Key Players in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(4):291–301.
- Tomassetti C, Johnson NP, Petrozza J, Abrao MS, Einarsson JI, Horne AW, et al. An International Terminology for Endometriosis, 2021. *J Minim Invasive Gynecol* [Internet]. 2021;28(11):1849–59. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2021.08.032>
- Tosti C, Pinzauti S, Santulli P, Chapron C, Petraglia F. Pathogenetic Mechanisms of Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod Sci* [Internet]. 2015 Sep 12;22(9):1053–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1933719115592713>
- Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The Role of Endometrium in Endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13(7):467–76.
- Vallvé-Juanico J, Houshdaran S, Giudice LC. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2019;25(5):565–92.
- Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis : pathogenesis and treatment. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2013;10(5):261–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2013.255>
- Vigano P, Candiani M, Monno A, Giacomini E, Vercellini P, Somigliana E. Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Hum Reprod* [Internet]. 2018 Mar 1;33(3):347–52. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/33/3/347/4675058>
- Viganò P, Vercellini P, Di Blasio AM, Colombo A, Candiani GB, Vignali M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 1991;56(5):894–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1936324>
- de Villiers WJS, Fraser IP, Gordon S. Cytokine and growth factor regulation of macrophage scavenger receptor expression and function. *Immunol Lett*. 1994;43(1–2):73–9.
- Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* [Internet]. 2018 Aug;174(5):1054–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418309115>
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2008 May 18;9(5):503–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni1582>
- Vivier E, Ugolini S. Regulatory Natural Killer Cells: New Players in the IL-10 Anti-Inflammatory Response. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009;6(6):493–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.001>
- Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, et al. Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Aug 1;68(15):6368–76. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-6768>
- Wang F, Lau JKC, Yu J. The role of natural killer cell in gastrointestinal cancer: killer or helper. *Oncogene* [Internet]. 2021;40(4):717–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-020-01561-z>
- Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D, Baird DT. Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1998 Apr 1;4(4):407–12. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/4.4.407>
- Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, et al. NF- $\kappa$ B Activation Is a Critical Regulator of Human Granulocyte Apoptosis in Vitro. *J Biol Chem*. 1999;274(7):4309–18.

- Watanabe Y, Dvorak HF. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Inhibits Anchorage-Disruption-Induced Apoptosis in Microvessel Endothelial Cells by Inducing Scaffold Formation. *Exp Cell Res* [Internet]. 1997 Jun;233(2):340–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482797935837>
- Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 1980 Sep;23(3):885–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7418287>
- West WH, Cannon GB, Kay HD, Bonnard GD, Herberman RB. Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J Immunol* [Internet]. 1977 Jan;118(1):355–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/299761>
- White JM. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2003 Oct;15(5):598–606. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403001108>
- Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2013 Feb 1;41(1):245–51. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/41/1/245/68185/Immune-modulation-of-T-cell-and-NK-natural-killer>
- Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: Relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* [Internet]. 1994;62(5):1086–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)57082-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57082-4)
- Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PAW. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis\*\*Presented at the 4th World Congress on Endometriosis, Salvador, Brazil, May 25 to 28, 1994. *Fertil Steril* [Internet]. 1995 Aug;64(2):340–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028216577334>
- Wu M-H, Sun HS, Lin C-C, Hsiao K-Y, Chuang P-C, Pan H-A, et al. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2002 Dec;8(12):1103–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12468643>
- Wu M, Shoji Y, Wu M. Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 by Prostaglandin E 2 in Peritoneal Macrophage Is Associated with Severity of Endometriosis. *Am J Pathol* [Internet]. 2005;167(4):1061–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61195-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61195-9)
- 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(6):1187–91.
- Xu H. Expressions of natural cytotoxicity receptor, NKG2D and NKG2D ligands in endometriosis. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2019;136(February):102615. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2019.102615>
- Yang FQ, Liu M, Yang FP, Zhang XL, Yang B, Guo CC, et al. Matrix metalloproteinase 2 ( MMP2 ) media la eliminación de MHC class I polypeptide-related sequence A ( MICA ) en el cáncer de células renales. *Actas Urológicas Españolas* [Internet]. 2014;38(3):172–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2013.09.015>
- Yang Y-M, Yang W-X. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jun 20;8(25):41679–89. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.16472>
- Yeaman GR, Collins JE, Fanger MW, Wira CR. CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: evidence for accumulation of cells by trafficking. *Immunology* [Internet]. 2001 Apr;102(4):434–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2567.2001.01199.x>
- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Endometriosis: Failure to Metabolize 17 $\beta$ -Estradiol 1. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1998 Dec;83(12):4474–80. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.83.12.5301>
- Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do “NK-reg cells” exist? *Cell Mol Immunol*. 2006a;3(4):241–54.
- Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do “NK-reg cells” exist? *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2006b Aug;3(4):241–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978532>
- Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2011 Jan 16;8(1):1–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/cmi201038>
- Zhao Y, Chen N, Yu Y, Zhou L, Niu C, Liu Y, et al. Prognostic value of MICA/B in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 10;8(56):96384–95. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.21466>
- Zhou H-E, Nothnick WB. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci* [Internet]. 2005 Jan 1;10(1–3):569–75. Available from:

- <https://imrpress.com/journal/FBL/10/1/10.2741/1552>
- Zingoni A, Vulpis E, Cecere F, Amendola MG, Fuerst D, Saribekyan T, et al. MICA-129 Dimorphism and Soluble MICA Are Associated With the Progression of Multiple Myeloma. *Front Immunol* [Internet]. 2018 May 1;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00926/full>
- Zingoni A, Vulpis E, Loconte L, Santoni A. NKG2D Ligand Shedding in Response to Stress: Role of ADAM10. *Front Immunol*. 2020;11(March):1–8.
- Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(1).
- Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* [Internet]. 1999 Apr;60(4):323–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019885998001281>
- Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(1–2):159–70.