

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ELBE - ESTUDO LONGITUDINAL DE BIOMARCADORES EM
ENDOMETRIOSE: PROJETO PILOTO**

por
Karla de Carvalho Schettino

Belo Horizonte
2022

DISSERTAÇÃO MCS-IRR K. C. SCHETTINO 2022

KARLA DE CARVALHO SCHETTINO

**ELBE - ESTUDO LONGITUDINAL DE BIOMARCADORES EM
ENDOMETRIOSE: PROJETO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Coorientação: Dr. João Oscar de Almeida Falcão Júnior

Belo Horizonte
2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

C253e
2022

Schettino, Karla de Carvalho

ELBE – Estudo Longitudinal de biomarcadores em endometriose: projeto piloto / Karla de Carvalho Schettino. – Belo Horizonte, 2022.

XIV, 95 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88 – 92

Dissertação – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciência da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia celular e molecular.

1. Endometriose/diagnóstico 2. Biomarcadores imunológicos 3. Estudos longitudinais I. Título. II. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal (Orientador). III. Falcão Júnior, João Oscar de Almeida (Coorientador).

CDD – 22. ed. – 618.1

KARLA DE CARVALHO SCHETTINO

**ELBE - ESTUDO LONGITUDINAL DE BIOMARCADORES EM
ENDOMETRIOSE: PROJETO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde Area de Concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. João Oscar de Almeida Falcão Júnior (Hospital Felício Rocho) Titular

Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão (Hospital das Clínicas - USP) Titular

Prof. Dr. Soraya Torres Gaze Jangola (IRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Gabriel da Rocha Fernandes (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 24/02/2022

Dedico este trabalho

Ao João Oscar, meu maior exemplo de profissional, que, com sua mania de nunca se aquietar e sempre agregar pessoas e valores a tudo que faz, consegue, constantemente, transformar pequenos projetos em grandes feitos.

À minha mãe, Daisy, e aos meus irmãos, Renata e Francisco, por serem, sempre, o meu porto seguro.

Ao meu pai, Francisco que, mesmo não estando conosco fisicamente, está presente em todos os meus passos.

Frase. *“Pense, acredite, sonhe e atreva-se!”*

Autor. Walt Disney

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Dra. Andrea Teixeira que com sua exuberante dignidade profissional, ética e liderança generosa é, e sempre será, exemplo e fonte de inspiração para todos os envolvidos neste projeto.

Ao Dr. João Oscar e ao Dr. Marcelo Pascoal por me apresentarem a Fiocruz, por confiarem a mim a execução deste trabalho e pela parceria e paciência necessárias nesta jornada.

Agradeço à diretoria do Hospital Felício Rocho, especialmente ao Dr. Francisco Guerra, pelo apoio imediato a este estudo, tão necessário para executá-lo.

Aos meus colegas da equipe de Ginecologia do Hospital Felício Rocho, sobretudo à Fernanda Alves, Dra. Gabriela Braga e Dra. Natália Amorim, por fazerem o meu cotidiano repleto de companheirismo e diversão.

À equipe de Anestesiologia do Hospital Felício Rocho, por abraçar o ELBE e permitir que seu desenvolvimento ocorresse.

Aos funcionários do Felício Rocho, principalmente à Marley Oliveira e Cristiane Martins da Unidade de Saúde da Mulher e à Amanda Damasceno do Núcleo de Ciências, por sempre responderem às minhas demandas com prontidão e solicitude inigualáveis.

Aos colegas e colaboradores do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, nosso querido GIPB, pelo acolhimento e orientações. À Jordana Fradico e à Nani Oliveira, pelo cuidado com nosso projeto e pela disponibilidade por dois anos!

Às pacientes, pessoas sem as quais este estudo não seria viável, agradeço não só pela confiança, como também pelo entusiasmo e motivação constantes.

Finalmente, agradeço à Fiocruz Minas, à CAPES e ao CNPq, instituições responsáveis pelo desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, muito prevalente, de difícil diagnóstico e sem biomarcadores diagnósticos ou prognósticos validados e disponíveis para uso clínico, o que caracteriza uma prioridade de pesquisa. Objetivo: selecionar biomarcadores imunológicos para o diagnóstico e monitoramento da endometriose. Metodologia: análise dos dados clínicos, a histopatologia do endométrio eutópico e ectópico e a detecção de biomarcadores no sangue periférico de 61 mulheres atendidas na Unidade de Saúde da Mulher do Hospital Felício Rocho que foram divididas em 3 grupos, Controle (n=20), Endometriose Não Grave (n = 20) e Endometriose Grave (n = 21). Resultados: a presença de sintomas como dismenorreia, dispareunia e dor pélvica crônica foi significativamente mais prevalente em participantes com endometriose quando comparado com grupo controle (p 0,002; p 0,004; p 0,03, respectivamente). Na comparação dos resultados do endométrio eutópico *versus* endométrio ectópico, as presenças de células linfóides e macrófagos foram significativamente superiores no endométrio ectópico (p 0,027 e p 0,000, respectivamente). A análise das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento permitiu a seleção dos biomarcadores imunológicos CCL11, CXCL8, IL-9, CCL3 e IL-7 e a construção de modelos multivariados com variáveis histopatológicas para discriminação dos grupos: mulheres não portadoras de endometriose e mulheres portadoras de endometriose não grave (acurácia de 65,6% e área sob curva ROC de 63%); mulheres portadoras de endometriose não grave e mulheres portadoras de endometriose grave (acurácia de 80,5% e área sob curva ROC de 84%). Conclusão: os biomarcadores imunológicos selecionados neste estudo têm potenciais usos diagnóstico e prognóstico. Estudos complementares e multicêntricos são necessários para validação e uso clínico desses biomarcadores imunológicos na endometriose.

Palavras-chave: Endometriose; biomarcadores; imunologia.

ABSTRACT

Endometriosis is a very prevalent, chronic inflammatory disease. Due to a lack of validated diagnostic or prognostic biomarkers available for clinical use, It is particularly difficult to diagnose, which characterizes a research priority. Objective: This study aims to select immunological biomarkers for the diagnosis and monitoring of endometriosis. Methodology: The analysis of clinical data, histopathology of eutopic and ectopic endometrium, and detection of biomarkers in peripheral blood of 61 women treated at the Women's Health Unit of Hospital Felício Rocho. These female patients were divided into 3 groups, Control (n=20), Non-Severe Endometriosis (n = 20) and Severe Endometriosis (n = 21). Results: The presence of symptoms such as dysmenorrhea, dyspareunia, and chronic pelvic pain were significantly more prevalent in participants with endometriosis when compared to the control group (p 0.002; p 0.004; p 0.03, respectively). Comparing the results of the eutopic endometrium with the ectopic endometrium, we noticed that the presence of lymphoid cells and macrophages was significantly higher in the ectopic endometrium (p 0.027 and p 0.000, respectively). The analysis of cytokines, chemokines, and growth factors enabled the selection of immunological biomarkers CCL11, CXCL8, IL-9, CCL3, and IL-7, as well as the development of multivariate models with histopathological variables to differentiate the following groups: women without endometriosis and women with non-severe endometriosis (accuracy of 65.6% and area under ROC curve of 63%); women with non-severe endometriosis and women with severe endometriosis (accuracy of 80.5% and area under ROC curve of 84%). Conclusion: The immunological biomarkers selected in this study have potential diagnostic and prognostic uses. Complementary and multicenter studies are necessary for the validation and clinical use of these immunological biomarkers in endometriosis.

Keywords: Endometriosis; biomarkers; immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos macroscópicos das lesões endometrióticas	200
Figura 2. Localização das lesões endometrióticas	21
Figura 3. Diagnóstico histológico da endometriose	24
Figura 4. Patogênese da endometriose	30
Figura 5. Microambiente da lesão endometriótica	41
Figura 6. O curso da endometriose	42
Figura 7. Delineamento metodológico do Projeto piloto dentro do ELBE	46
Figura 8. Idade, peso, altura e índice de massa corporal (IMC) das participantes nos subgrupos do ELBE	52
Figura 9. Intensidade da dismenorreia nas participantes do ELBE	54
Figura 10. Gráfico de setor dos exames de imagem realizados no ELBE	58
Figura 11. Células linfóides no endométrio eutópico	61
Figura 12. Macrófagos no endométrio eutópico	62
Figura 13. Células linfóides no endométrio ectópico	63
Figura 14. Macrófagos no endométrio ectópico	64
Figura 15. Aspectos morfológicos dos endométrios eutópico e ectópico	65
Figura 16. Perfil de quimiocinas no sangue periférico	67
Figura 17. Perfil de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico	70
Figura 18. Perfil de citocinas reguladoras no sangue periférico	72
Figura 19. Perfil de fatores de crescimento no sangue periférico	74
Figura 20. Modelo multivariado preditivo de classificação dos grupos Controle e Endometriose (ENDO)	77
Figura 21. Curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos Controle versus Endometriose	78
Figura 22. Modelo multivariado preditivo de classificação dos grupos Endometriose grave (EG) versus Endometriose não grave (ENG)	79
Figura 23. Curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos EG versus ENG	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da endometriose proposta pela ASRM.....	22
Tabela 2. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no sangue periférico	49
Tabela 3. Prevalência de dismenorreia no ELBE	53
Tabela 4. Prevalência de dispareunia no ELBE	54
Tabela 5. Manifestação de DPC no ELBE	55
Tabela 6. Escala subjetiva de dor nas participantes do ELBE	56
Tabela 7. Localização das lesões endometrióticas	59
Tabela 8. Quimiocinas no sangue periférico.	66
Tabela 9. Citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico.....	68
Tabela 10. Citocinas reguladoras no sangue periférico	71
Tabela 11. Fatores de crescimento no sangue periférico.....	73
Tabela 12. Regressão logística binária de variáveis clínicas e laboratoriais distintivas dos grupos EG e ENG.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E

ACO -	anticoncepcional combinado oral
AAGL -	<i>American Association of Gynecologic Laparoscopists</i>
ASMR -	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
bi -	bilhões
CCL -	quimiocina da família CC
CD -	<i>cluster of differentiation</i>
células NK -	células natural killer
CK2 -	proteína quinase 2
CSF -	fator estimulador de colônias
CXCL -	quimiocina ligante
CYP19 -	aromatase citocromo P450
DC -	células dendríticas
DIU -	dispositivo intrauterino
DNA -	ácido desoxirribonucleico
DPC -	dor pélvica crônica
EGF -	fator de crescimento epidérmico
ELBE -	Estudo Longitudinal de Biomarcadores em Endometriose
ENDO -	Endometriose
ESC -	<i>endometrial stromal cells</i>
ESHRE -	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FGF -	fator de crescimento de fibroblasto
FIV -	fertilização <i>in vitro</i>
GnRH -	hormônio liberador de gonadotrofina
GWAS -	<i>Genome-wide Association Study</i>
HE -	hematoxilina e eosina
HFR -	Hospital Felício Rocho
HGF -	fator de crescimento de hepatócitos
IFN- γ -	interferon gama
IGF -	fator de crescimento semelhante à insulina
IL -	interleucina
IMC -	índice de massa corporal

JNK -	c-Jun N-terminal quinase
kg -	quilograma
<i>loci</i> -	regiões genômicas
m -	metro
mm -	milímetro
NF-κB -	fator nuclear kappa B
NIPTE -	Núcleo Integrado de Pesquisa e Tratamento da Endometriose
NKT -	células natural killer T
PGDF -	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2 -	prostaglandina E2
PGP9.5 -	produto de gene de Proteína 9.5
RE -	receptores de estrogênio
RM -	ressonância magnética
RNA -	ácido ribonucleico
ROS -	espécies reativas de oxigênio
SOD -	superóxido dismutase
sTNFR-I -	receptor do fator de Necrose Tumoral I solúvel
TC -	tomografia computadorizada
TENS -	neuroestimulação elétrica transcutânea
TGF -	fator de crescimento transformador
TNF-α -	fator de necrose tumoral alfa
USTV -	Ultrassom Transvaginal
VEGF -	fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Definição de endometriose e suas classificações	19
2.2 Sinais e sintomas da endometriose	22
2.3 Incidência, prevalência e diagnóstico da endometriose.....	23
2.4 Tratamentos e seguimento da endometriose	26
2.5 Repercussão da Endometriose na vida da mulher e da sociedade	28
2.6 Patogênese	29
<i>2.6.1 Teorias do aparecimento do endométrio ectópico.....</i>	<i>31</i>
<i>2.6.2 Alterações genéticas e epigenéticas na patogênese da endometriose</i>	<i>32</i>
<i>2.6.3 Sistema imune na patogênese da endometriose</i>	<i>33</i>
2.6.3.1 Mecanismos do sistema imune inato e a endometriose	34
2.6.3.2 Mecanismos do sistema imune adaptativo e a endometriose	37
2.6.3.3 Mediadores inflamatórios na endometriose	39
2.6.3.4 Eixo imunoangiogênico na endometriose	40
2.6.3.5 Interação imunoendócrina na endometriose	40
3. JUSTIFICATIVA.....	43
4. OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo geral	45
4.2 Objetivos específicos.....	45
5. POPULAÇÃO E METODOLOGIA	46
5.1 Delineamento metodológico e aspectos éticos do estudo.....	46
5.2 População do estudo	47
<i>5.2.1 Critérios de inclusão.....</i>	<i>47</i>

5.2.2 Critérios de exclusão.....	47
5.3 Coleta dos dados clínicos	47
5.4 Análise histopatológica do endométrio	48
5.5 Detecção de biomarcadores imunológicos no sangue periférico	49
5.6 Análise estatística	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1 Características clínicas.....	51
6.2 Aspectos histopatológicos do endométrio.....	60
6.2.1 Endometrio eutópico.....	60
6.2.2 Endometrio ectópico.....	62
6.3 Aspectos imunológicos no sangue periférico.....	65
6.4 Análises estatísticas multivariadas dos biomarcadores imunológicos	75
7. DISCUSSÃO	81
8. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88
9. ANEXO 1.....	93

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença inflamatória crônica, sem cura, estrogênio dependente definida pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. É uma doença de prevalência significativa, acometendo cerca de 10% da população feminina no menacme. Possui uma gama de sintomas possíveis, sendo os mais comuns a dismenorreia e a dispareunia, além de dor, por vezes incapacitante, e de infertilidade (*European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*, 2022). É uma patologia de difícil diagnóstico, que tem como padrão-ouro atual a detecção histopatológica de endométrio ectópico em amostragem de lesões endometrióticas por meio da laparoscopia, um procedimento invasivo, de alto custo e de baixa disponibilidade para a população geral (DORIEN *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2012). Por possuir repercussões negativas não só na vida da paciente, mas também na de seus parceiros, familiares e sociedade em geral, além de ter elevado custo envolvido em seu tratamento e manejo, a endometriose é considerada um problema de saúde pública (ESHRE, 2022). Por isso, a descoberta e validação de biomarcadores para a endometriose são prioridades na área da pesquisa (DORIEN *et al.*, 2018).

A patogênese da endometriose ainda é desconhecida. As principais hipóteses que tentam explicar a origem da glândula e/ou estroma endometriais ectópicos são: menstruação retrógrada, metaplasia do celoma, disseminação vascular e linfática e o sangramento uterino neonatal; sendo a hipótese da menstruação retrógrada a mais antiga e relevante. Nos últimos anos, a partir do desenvolvimento do sequenciamento do ácido desoxirribonucleico (DNA), a identificação de fatores de risco genéticos para a endometriose se tornou possível (TAKEBAYASHI *et al.*, 2015; SYMONS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2005; IZUMI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2000; LAGANA *et al.*, 2016).

Os implantes endometriais ectópicos sofrem importantes modificações epigenéticas e na expressão gênica em mulheres suscetíveis, com ativação diferenciada de genes relacionados à adesão, proliferação e invasão celulares, além de genes relacionados à resposta inflamatória e biossíntese esteróides. Este novo microambiente tecidual peritoneal criado favorece a sobrevivência celular, especialmente das células da imunidade inata (macrófagos, neutrófilos, células

dendríticas, células natural killer (NK) e mastócitos) e de seus biomarcadores (TAKEBAYASHI *et al.*, 2015; SYMONS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2005; IZUMI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2000; LAGANA *et al.*, 2016).

Macrófagos classicamente ativados (M1) apresentam aumento da expressão do fator de transcrição nuclear pró-inflamatório-kB (NF-kB) e de citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos macrófagos alternativamente ativados (M2), tendo assim papel fundamental no recrutamento de neutrófilos, perpetuando o microambiente ideal para o desenvolvimento de endometriose. Evidências recentes sugerem a possibilidade de células T não convencionais (células T da imunidade inata), especialmente células natural killer T (NKT), desempenharem papel protetor na endometriose. Isso porque é sabido que a quantidade de NKT, interferon- gama (IFN- γ) e interleucina (IL) 4 correlaciona-se inversamente com o estágio da doença. Entretanto, nas pacientes acometidas por essa patologia, há redução de NKT e dos níveis de IFN- γ e IL-4, o que possibilita o agravamento da afecção. A expressão aumentada de células T gama delta e moléculas de adesão em tecido endometriótico também tem sido descrita (TAKEBAYASHI *et al.*, 2015; SYMONS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2005; IZUMI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2000; LAGANA *et al.*, 2016).

Em relação aos biomarcadores circulantes, há evidências crescentes de elevação acentuada de diferentes fatores solúveis (como autoanticorpos, citocinas pró-inflamatórias, citocinas angiogênicas, quimiocinas seletivas para linhagem macrofágica, fatores de crescimento angiogênico e teciduais, enzimas, hormônios, espécies reativas do oxigênio e prostaglandinas), refletindo inflamação intensa e imunomodulação desregulada na endometriose (SYMONS *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2018; KOBAYASHI *et al.*, 2009). Esse aumento pode ser detectado no sangue, no líquido peritoneal e nas próprias lesões.

Um exemplo para melhor compreensão de como esses biomarcadores são fundamentais para o desenvolvimento de focos de endometriose é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A expressão do VEGF ocorre no estroma, epitélio glandular e macrófagos locais e exerce efeito sobre o recrutamento de células imunes para a lesão endometriótica, sugerindo regulação imune da angiogênese (GOTERI *et al.*, 2004). Outro biomarcador que está potencialmente envolvido na patogênese da endometriose é a CXCL-8, uma citocina angiogênica que estimula o crescimento de células endometriais tópicas e ectópicas, provavelmente através da

indução da produção de fator de necrose tumoral (TNF) - alfa (α), e também correlaciona-se com a gravidade da doença (MALHOTRA *et al.*, 2012). Os biomarcadores da imunidade inata estão presentes também no líquido peritoneal. Neste local, é possível detectar TNF- α e IL-1 β , substâncias que podem contribuir para a adesão das células endometriais e são capazes ativar c-Jun N-terminal quinase (JNK), que regulam positivamente a expressão de citocinas inflamatórias (UZ *et al.*, 2011).

Considerando-se também as necessárias habilidades de evasão da apoptose para a sobrevivência do tecido endometrial ectópico, os biomarcadores *cluster of differentiation* (CD) CD95/FAS, inibidor da apoptose, apresentaram resultados propícios na endometriose, quando comparados aos grupos controles de participantes saudáveis (DORIEN *et al.*, 2018).

Além de promoverem ações necessárias para o desenvolvimento dos focos de endométrio ectópicos, os biomarcadores promovem a modulação de resposta imune inflamatória. Níveis elevados da expressão de IL-10, um potente modulador das respostas inflamatórias e da função das células imunes, foram observados na endometriose (PODGAEC *et al.*, 2010). Complementarmente, níveis elevados da expressão de fator de transformação do crescimento (TGF) - beta (β) 1 induziram a secreção de IL-6 nas células do estroma endometrial e a fibrogênese pélvica. A IL-6 é uma das principais citocinas na cascata inflamatória na endometriose e sua elevação na cavidade peritoneal e no sangue periférico das pacientes correlaciona-se com a atividade da doença (SAITO *et al.*, 2011). Mais recentemente, concentrações elevadas de IL-33 foram observadas no soro e líquido peritoneal de mulheres com endometriose de infiltração profunda, indicando influência na tolerância dos macrófagos (MILLER *et al.*, 2017).

O sangue periférico é considerado uma importante fonte para identificação de biomarcadores. Entre as diversas citocinas previamente investigadas, a IL-6 tem sido a mais amplamente estudada. Além dela, algumas proteínas inflamatórias e biomarcadores do estresse oxidativo são, também, promissores, em especial o Fator de Necrose Tumoral I (sTNFR-I) e o marcador do estresse oxidativo superóxido dismutase (SOD). Outros biomarcadores associados à imunopatogênese da endometriose têm grande potencial diagnóstico. Dentre eles, estão anormalidades qualitativas e/ou quantitativas nos níveis das citocinas IL-27 e TGF-b, na função de

subconjuntos de células T e na concentração de auto-anticorpos circulantes e galectina-9. Todas essas possibilidades, quando comparadas com CA-125 e CA-19.9, são promissoras para o diagnóstico não invasivo da endometriose porque apresentaram maior sensibilidade nos estágios I-II da doença (CHANG *et al.*, 2017).

Além do sangue periférico, o endométrio tem sido investigado como uma fonte de biomarcadores. Entre diversos biomarcadores estudados, o Produto de Gene de Proteína 9.5 (PGP9.5) e a Aromatase Citocromo P450 (CYP19) apresentaram resultados promissores e metodologicamente reproduzíveis. A análise da densidade das fibras nervosas usando PGP9.5 como marcador imuno-histoquímico pan-neural apresentou sensibilidade média de 96% (IC 95% de 91 a 100%) e especificidade média de 86% (IC 95% de 70 a 100%), enquanto o CYP19, uma isoforma do citocromo P450, mostrou uma sensibilidade média de 77% (IC 95% de 70 a 85%) e especificidade média de 74% (IC 95% de 65 a 84%) (GUPTA *et al.*, 2016).

Apesar da ampla pesquisa de biomarcadores, particularmente no sangue periférico e endométrio, nenhum deles está consolidado e liberado para aplicação no diagnóstico da endometriose atualmente. Este fato abre importante janela de oportunidade para seleção de novos biomarcadores relacionados à imunopatogênese da endometriose por meio de estudos inicialmente experimentais e de validação de testes diagnósticos (AHN; SINGH; TAYADE, 2017; REIS; MONTEIRO; CARNEIRO, 2017). Assim, o desenvolvimento de biomarcadores, preferencialmente integrados, na forma de painel de biomarcadores, possibilitará a translação do conhecimento atual e uso clínico de novos biomarcadores no diagnóstico não invasivo, monitoramento e tratamento da endometriose.

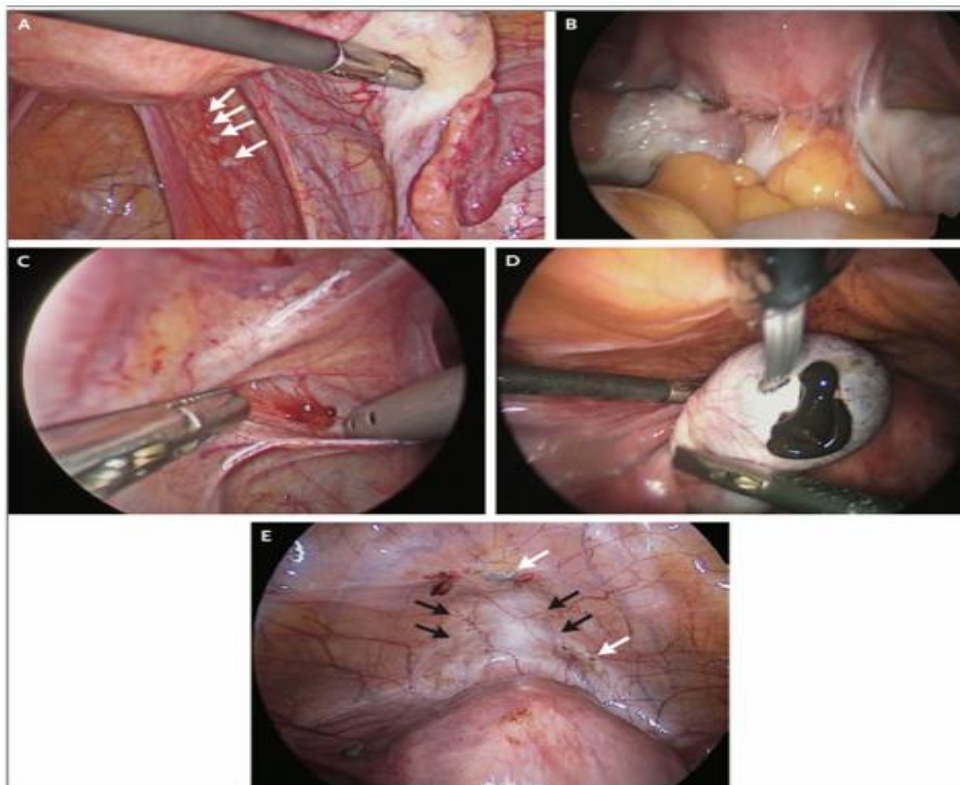
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Definição de endometriose e suas classificações

A definição clássica de endometriose, estabelecida em 1927 por John A. Sampson e mantida até os dias atuais, é a presença de tecido endometrial (glândula e/ou estroma) fora do útero (CHAPRON *et al.*, 2019). Este tecido ectópico induz uma reação inflamatória crônica (DUNSELMAN *et al.*, 2013) causando uma doença benigna, sem cura, heterogênea, sistêmica, crônica, inflamatória, estrogênio-dependente e imune (CHAPRON *et al.*, 2019).

É uma patologia heterogênea, com inúmeros aspectos macroscópicos possíveis e 3 fenótipos tradicionalmente reconhecidos: (i) lesão peritoneal superficial, forma menos severa da doença e consiste em lesões no peritônio com profundidade menor que 3-5 mm; (ii) endometrioma ovariano, são as lesões císticas de tecido endometrial ectópico que crescem e se desenvolvem dentro do ovário e é fator prognóstico, sendo indicador de doença severa; (iii) endometriose profunda, forma mais severa composta por lesões que penetram os tecidos por mais de 5 mm e raramente apresenta-se de forma isolada, sendo considerada uma doença abdominopélvica multifocal (CHAPRON *et al.*, 2019). A Figura 1 ilustra alguns dos aspectos macroscópicos da endometriose.

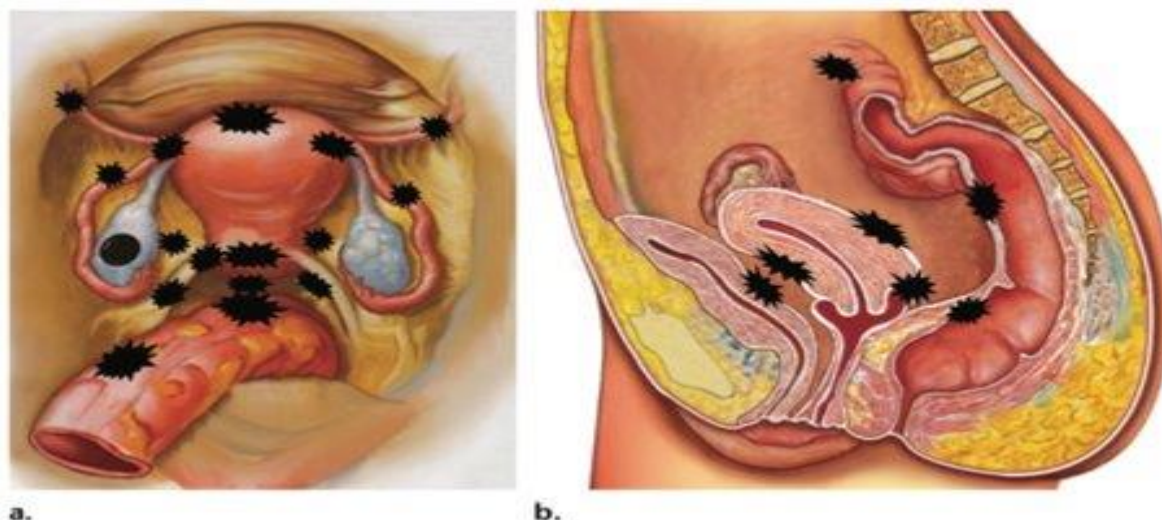
Figura 1. Aspectos macroscópicos das lesões endometrióticas



Nota: A) Setas brancas indicam 4 focos de lesão endometriótica peritoneal superficial na parede pélvica lateral direita. B) Aderências firmes entre parede anterior do intestino e parede posterior do útero, causando obliteração do fundo de saco posterior. C) Lesão endometriótica peritoneal superficial vermelha com hiperemia local. D) Endometrioma em ovário direito, com saída de secreção achocolatada característica. E) Setas pretas apontam uma lesão de endometriose profunda em bexiga e as setas brancas mostram lesões peritoneais preta e marrom. Fonte: Adaptado de Zondervan *et al.*, (2020).

As lesões endometrióticas usualmente acometem órgãos pélvicos, mas possuem o potencial de afetar qualquer órgão do corpo. Os locais de desenvolvimento mais comuns pertencem ao aparelho genital, sendo, os ovários e os ligamentos uterossacros os sítios mais envolvidos. Dentre as manifestações extragenitais, a lesão intestinal é a mais comum e sua presença no aparelho urinário é rara (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021). A endometriose pode acometer locais extrapélvicos, como diafragma, pleura, umbigo, cicatrizes, parede abdominal, pleura, pericárdio, dentre outros (CHAPRON *et al.*, 2019; ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021). A real porcentagem de acometimento de cada órgão ou estrutura é incerta, variando amplamente entre os estudos (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021).

Figura 2. Localização das lesões endometrióticas



Nota: desenho da anatomia da pelve feminina no plano axial (a) e sagital (b) mostrando a possível localização das lesões endometrióticas na pelve. O círculo preto em “a” representa um endometrioma. Fonte: Adaptado de Chamié *et al.*, (2011).

A endometriose possui diferentes formas de estratificação. Vinte e dois sistemas já foram publicados entre 1973 e 2021 e ainda não há acordo internacional sobre como descrever nem como classificar esta patologia, especialmente por causa da pobre correlação entre as classificações com sintomas, desfechos de fertilidade e/ou prognóstico (VERMEULEN *et al.*, 2021). Dentre todas as sistematizações, a mais utilizada em estudos e de maior validação científica é a feita pela American Society for Reproductive Medicine (ASRM) que reconhece esta patologia em quatro estágios, sendo eles: I ou mínima, II ou leve, III ou moderada e IV ou severa. A graduação é feita de acordo com os achados cirúrgicos e considera o tamanho, profundidade e localização das lesões, além da existência e intensidade de aderências entre os órgãos acometidos (CHAPRON *et al.*, 2019). A Tabela 1 expõe a classificação proposta pela ASRM.

Tabela 1. Classificação da endometriose proposta pela ASRM

Nome da paciente: _____ Data: __/__/__				
Estágio I (Mínima): 1-5 Estágio II (Leve): 6-15 Estágio III (Moderada): 16-40 Estágio IV (Severa): > 40				
PONTUAÇÃO TOTAL: _____				
	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
Ovário E	Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
OBSTRUÇÃO DO FUNDO DE SACO POST.	Parcial		Completa	
	4		40	
	Aderências	Envolvendo < 1/3	Envolvendo 1/3 - 2/3	Envolvendo > 2/3
Ovário D	Finas	1	2	4
	Densas	4	8	16
Ovário E	Finas	1	2	4
	Densas	4	8	16
Trompa D	Finas	1	2	4
	Densas	4	8	16
Trompa E	Finas	1	2	4
	Densas	4	8	16

Fonte: Adaptado de Hoffman *et al.* (2013).

As limitações das classificações existentes, como já mencionado, tem impulsionado grupos de trabalho e sociedades médicas no esforço de criar uma classificação com maior aplicabilidade clínica. O mais novo projeto neste sentido foi lançado pela *American Association of Gynecologic Laparoscopists* (AAGL), em 2021, que propôs uma classificação baseada em um sistema de pontuação categorizando a endometriose em quatro estádios (1 a 4). A iniciativa tem como objetivo apresentar um sistema que, baseado em características anatômicas dos achados patológicos, faça uma melhor predição da complexidade cirúrgica de cada caso (ABRÃO *et al.*, 2021). Os resultados deste estudo multicêntrico abrem novas perspectivas para a aplicabilidade destes instrumentos de classificação e apontam para a necessidade de mais esforços na busca de instrumentos que possam ter maior capacidade preditiva dos desfechos clínicos e reprodutivos.

2.2 Sinais e sintomas da endometriose

A endometriose é uma doença multifacetada, podendo variar de quadros floridos a assintomáticos. As manifestações mais marcantes são dor pélvica crônica e

infertilidade (CHAPRON *et al.*, 2019; ESHRE, 2022). Os sintomas pélvicos como dor pélvica cíclica, dismenorreia e dispareunia profunda são as manifestações clássicas desta patologia. Além deles, as pacientes podem apresentar dor pélvica crônica, dor abdominal, queixas intestinais cíclicas como disquesia e/ou alteração do hábito intestinal, fadiga, cansaço, infertilidade, inchaço abdominal, dor cíclica no ombro, hematúria, sangramento retal, hematúria, disúria, inchaço cíclico de cicatrizes, pneumotórax catamenial, dentre outros. O quadro clínico causado pela endometriose está relacionado com a localização das lesões endometrióticas (DUNSELMAN *et al.*, 2013; ESHRE, 2022).

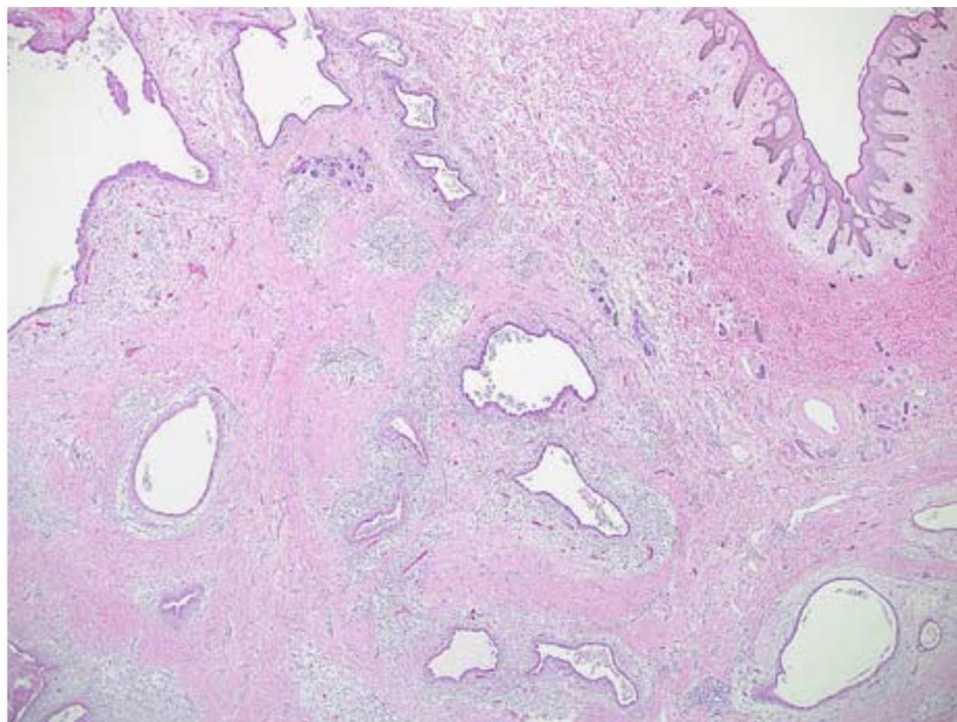
Estudos apontam uma longa lista de sintomas relacionados à endometriose, porém não foi demonstrado um valor preditivo destes sintomas para a presença da doença. A presença de múltiplos sintomas relacionados à endometriose aumenta a chance de confirmação da patologia (DUNSELMAN *et al.*, 2013; ESHRE, 2022).

2.3 Incidência, prevalência e diagnóstico da endometriose

A incidência da endometriose é desconhecida e a sua prevalência é estimada entre 6 a 10% da população feminina no menacme (CHAPRON *et al.*, 2019), assim, a estimativa atual é que aproximadamente 190 milhões de mulheres ao redor do mundo são acometidas por esta doença (ESHRE, 2022).

O diagnóstico padrão-ouro da endometriose é feito através da combinação da realização de laparoscopia com identificação macroscópica de lesões endometrióticas e verificação histopatológica de glândulas e/ou estroma endometrial ectópico nos tecidos ressecados. A laparoscopia deve ser realizada por uma equipe treinada e de forma sistematizada, com a checagem dos locais de maior probabilidade de desenvolvimento de lesões endometrióticas (DUNSELMAN *et al.*, 2013). O diagnóstico histológico é baseado na presença dos achados microscópicos de glândulas e/ou estroma endometriais e/ou macrófagos carregados de hemossiderina. A presença de variantes morfológicas, como a endometriose estromal, a endometriose polipóide e a endometriose atípica, podem dificultar o diagnóstico (ARAFAH; AKAHTAR, 2021). A Figura 3 mostra como é um foco de endometriose ao microscópio.

Figura 3. Diagnóstico histológico da endometriose



Nota: foco de endometriose composto por glândulas endometriais e estroma envolvidos por tecido subcutâneo e pele (hematoxilina e eosina (HE))

Fonte: Adaptado de ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021.

Na maioria dos casos, o diagnóstico da endometriose é realizado no final da terceira ou início da quarta década de vida da mulher, sendo 28 anos a idade média mundial ao diagnóstico, oscilando entre 26,8 a 34,1 anos (BERNUI *et al.*, 2011).

Estudos demonstram um grande atraso para realizar o diagnóstico de endometriose (DUNSELMAN *et al.*, 2013). O tempo médio global estimado entre o início dos sintomas e o estabelecimento do diagnóstico desta doença é entre 6 a 10 anos, sendo o do Brasil de cerca de 7,5 anos (BERNUI *et al.*, 2011). Dentre as justificativas para este retardo estão: diagnóstico padrão-ouro de elevado custo e invasivo, a ausência de suspeição pelos próprios profissionais da área da saúde na assistência primária, normalização da dor pélvica como uma característica inerente à mulher; pluralidade quanto às manifestações clínicas; inexistência de exames laboratoriais (sangue ou urina) capazes de auxiliar e/ou direcionar a detecção da doença; uso frequente de anticoncepcionais combinados oral (ACOs) como método contraceptivo ocasionando supressão dos sintomas e a dificuldade de acesso aos exames de imagem utilizados na investigação da doença (DUNSELMAN *et al.*, 2013; BERNUI *et al.*, 2011).

Como resposta a todas as adversidades elencadas acima, advoga-se cada vez mais a favor daquilo que Charles Chapron *et al.* (2019) chamou de diagnóstico clínico da endometriose. Neste modelo, a base do diagnóstico é a história clínica da paciente, corroborada pelo exame físico e exames de imagem, sendo finalmente confirmado pela histologia da lesão endometriótica coletada durante uma laparoscopia, apenas quando necessário (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013). O relato obtido com a anamnese é essencial para a suspeição e a natureza cíclica do quadro álgico é uma característica chave, apesar de não ser obrigatória nem patognomônica (CHAPRON *et al.*, 2019). O exame físico consiste em inspeção e palpação abdominal, exame especular da vagina e palpação bimanual retovaginal e deve ser realizado em todas as mulheres, apesar da acurácia diagnóstica ser baixa e examinador dependente (ESHRE, 2022; BERNUIT *et al.*, 2011). Ele deve ser direcionado na tentativa de identificar sinais indiretos e sugestivos da endometriose, como lesões azuladas na vagina e/ou fórnice vaginal, presença de nodulações e/ou áreas de espessamento envolvendo qualquer localização pélvica, massas anexiais, redução da mobilidade uterina e dor à mobilização das estruturas pélvicas. O achado de uma ou mais alterações não determina o diagnóstico de endometriose da mesma forma que um exame físico normal não exclui a possibilidade de a doença estar presente. (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013). Exames de imagem levaram a significativa melhora no diagnóstico da endometriose, principalmente o Ultrassom Transvaginal (USTV) e a Ressonância Magnética (RM) da pelve (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013), principalmente se forem realizados após preparo intestinal e aplicação de protocolos para potencializar o mapeamento das lesões.

Nenhum teste biológico ou biomarcador foi identificado como possibilidade de auxiliar no diagnóstico da endometriose até hoje, apesar das inúmeras pesquisas que existem neste sentido. (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013; ESHRE, 2022). A descoberta de novos biomarcadores permanece como prioridade nas pesquisas relacionadas à endometriose, uma vez que o uso de métodos laboratoriais não-invasivos são primordiais para otimizar o diagnóstico desta doença, além de evitar a realização de laparoscopias desnecessárias (REIS *et al.*, 2012).

2.4 Tratamentos e seguimento da endometriose

Existem três principais opções terapêuticas para a Endometriose: tratamento medicamentoso, cirurgia e reprodução assistida (CHAPRON *et al.*, 2019).

O tratamento medicamentoso fundamenta-se em adequada analgesia e bloqueio hormonal ovariano, deve ser iniciado sem confirmação histológica e os sintomas álgicos devem ser tratados sem morosidade com intuito de evitar a sensibilização central da dor (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013). Antes de iniciar o tratamento empírico, outras causas de dor pélvica devem ser excluídas (DUNSELMAN *et al.*, 2013).

Como a Endometriose é uma doença estrogênio-dependente, a supressão hormonal é uma abordagem atrativa no tratamento, sendo o bloqueio ovariano a primeira opção terapêutica (CHAPRON *et al.*, 2019). Ele age suprimindo as flutuações hormonais, tanto das gonadotropinas quanto dos hormônios ovarianos, resultando na inibição da ovulação e da menstruação, com conseqüente redução da inflamação. É um tratamento efetivo para controle dos sintomas, porém não é curativo e não elimina ou reduz as lesões preexistentes, além de não ser indicado para mulheres que desejam engravidar de imediato. Dentre as opções, tem-se o ACO, anel vaginal, patch transdérmico, progestágenos orais, progestágeno subdérmico, análogos de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), antiprogestágenos e inibidores da aromatase (DUNSELMAN *et al.*, 2013; ESHRE, 2022). O tratamento hormonal deve ser realizado também após o tratamento cirúrgico, em pacientes sem desejo reprodutivo, para prevenir o quadro de dor e a recorrência de lesões endometrióticas, especialmente os endometriomas ovarianos. Os melhores resultados são observados quando o intervalo entre a realização da cirurgia e o uso de hormônios é o menor possível (CHAPRON *et al.*, 2019).

O tratamento cirúrgico da endometriose é caracterizado pela realização da exérese das lesões endometrióticas, e não mais na cauterização das mesmas, associado com a lise de aderências e restabelecimento da anatomia, deve ser realizado por videolaparoscopia, assistida ou não por robô, e por equipe que tenha expertise nesta patologia (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013). É indicada em quatro situações: (i) existência de comprometimento da função do órgão acometido; (ii) infertilidade, após avaliação individualizada; (iii) crescimento significativo das lesões; (iv) persistência do quadro álgico em vigência do tratamento

medicamentoso. A cirurgia pode ser completa, quando há ressecção de todas as lesões macroscópicas, ou incompleta, quando há persistência de lesões após a cirurgia, e não pode ser considerada curativa porque não trata a causa base da doença (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013). É uma parte importante do manejo das pacientes com endometriose, pois a remoção das lesões está associada a alívio do quadro álgico e melhora da qualidade de vida das mulheres acometidas (DUNSELMAN *et al.*, 2013). Entretanto, complicações graves pós operatórias podem ocorrer, especialmente em quadros complexos, e a cirurgia tem potencial efeito negativo sobre a reserva ovariana após abordagem cirúrgica do(s) ovário(s) (CHAPRON *et al.*, 2019). O real efeito da cirurgia sobre a fertilidade ainda é incerto e acredita-se que a remoção cirúrgica das lesões possa favorecer o desfecho das técnicas de reprodução assistida por reduzir o caráter inflamatório pré existente na pelve, favorecendo assim a implantação e desenvolvimento do embrião na cavidade uterina.

Como a infertilidade é um sintoma prevalente nas mulheres portadoras de endometriose, uma proporção significativa das pacientes necessitam de técnicas de reprodução assistida para engravidar (DUNSELMAN *et al.*, 2013). A fertilização *in vitro* (FIV) é uma opção adequada, por oferecer uma forma de contornar a inflamação pélvica existente. O uso da técnica de inseminação intrauterina na endometriose é controverso e sua indicação parece ser mínima. Os resultados da reprodução assistida são satisfatórios, independentemente do fenótipo da endometriose (CHAPRON *et al.*, 2019).

A crescente prática de tratamentos não-medicamentosos pelas mulheres portadoras de endometriose pode refletir a insatisfação das mesmas com a assistência à saúde recebida (DUNSELMAN *et al.*, 2013; ESHRE, 2022). Na literatura, existem apenas evidências limitadas para o uso de da medicina complementar ou alternativa, como neuromoduladores, anestesia, terapia comportamental, reflexologia, drogas recreativas, homeopatia, psicoterapia, exercício físico, acupuntura, neuroestimulação elétrica transcutânea (TENS), suplementação nutricional, medicina chinesa, fisioterapia, psicoterapia, para o manejo do quadro álgico na endometriose (DUNSELMAN *et al.*, 2013). Sendo assim, a adoção de estratégias que visam o controle dos sintomas, o aumento da qualidade de vida e melhoria do bem estar

psicológico das pacientes com endometriose pode ser estimulada, sem, entretanto, haver a recomendação para nenhuma prática específica (ESHRE, 2022).

Existem terapias emergentes promissoras surgindo, mas ainda necessitam de maiores avaliações. Entre as substâncias, estão antagonistas de GnRH, moduladores seletivos de receptores de estrogênio ou progesterona, drogas anti-angiogênicas, imunomoduladores antioxidantes e agentes epigenéticos (CHAPRON *et al.*, 2019).

A Endometriose é uma doença crônica, inflamatória e sem cura que exige acompanhamento contínuo e sua estratégia terapêutica precisa ter perspectiva de longo prazo. No manejo contemporâneo, a paciente precisa estar no centro das decisões terapêuticas e os profissionais da saúde devem focar mais na mulher do que na patologia em si, sendo o tratamento individualizado e ajustado de acordo com a intenção e prioridades da paciente. As estratégias podem variar de acordo com o país, com sistema de saúde, com a percepção dos sintomas e com o recurso disponível. Idealmente, a gerência das mulheres portadoras de endometriose deve ser realizada em centros de referência que ofereçam inúmeras abordagens terapêuticas em um contexto multidisciplinar e em diferentes frentes, atuando com a medicina tradicional e incentivando práticas como exercício físico regular, dieta anti-inflamatória, dentre outras (CHAPRON *et al.*, 2019). Mesmo sem evidências de benefícios do acompanhamento a longo prazo, o seguimento das mulheres portadoras de endometriose é desejável, especialmente naquelas que possuem endometrioma ovariano e lesões infiltrativas profundas. Contudo, a frequência apropriada de consultas para esta supervisão, assim como quais exames são necessários e em qual periodicidade, não está definido sendo, portanto, primordial a individualização destas decisões (ESHRE, 2022).

2.5 Repercussão da Endometriose na vida da mulher e da sociedade

A endometriose tem efeito importante na qualidade de vida das mulheres portadoras, com consequências negativas em suas atividades diárias, sexualidade, função reprodutiva, relações pessoais, trabalho e estudo (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013; ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021). A endometriose está associada a depressão e fadiga, levando a menor capacitação profissional e perda de produtividade laboral, com consequências monetárias (CHAPRON *et al.*, 2019).

O custo oriundo do tratamento da endometriose em centros de referência é vultoso, com valor anual presumido apenas na Europa de até E\$12,5 bi e de mais de U\$20 bi nos Estados Unidos. Esta estimativa evidencia que o fardo econômico desta doença é comparável ao de outras doenças crônicas, como a diabetes por exemplo (DUNSELMAN *et al.*, 2013; LE NXH, *et al.*, 2021).

Devido a todos estes aspectos, a endometriose deve ser considerada uma questão de saúde pública.

2.6 Patogênese

É sabido que a endometriose cursa com inflamação crônica e com concentrações elevadas de estrogênio, porém a etiologia precisa da doença permanece incerta. Possivelmente, isso pode ser atribuído à natureza complexa e multifatorial da doença, que envolve aspectos locais, genéticos, endócrinos e imunológicos (SYMONS *et al.*, 2018).

O curso natural da endometriose é indefinido em parte pelas incertezas sobre a patogênese e sobre a evolução das lesões endometrióticas. Durante cada ciclo menstrual, as lesões endometrióticas são responsáveis por repetir as injúrias teciduais e realizar seu reparo, o que ocasiona inflamação local, angiogênese e neurogênese. A cascata de eventos subsequente envolvidas na transição epitelial-mesenquimal e na transdiferenciação fibroblasto-mioblasto podem contribuir para aumentar a contratilidade do mioblasto, a produção de colágeno pelas células endometriais ectópicas, a progressiva metaplasia de músculos lisos e a fibrogênese uterina, culminando na transformação de tecido endometrial ectópico em fibrose. Esta progressão tecidual não está relacionada com aumento de severidade da doença (CHAPRON *et al.*, 2019).

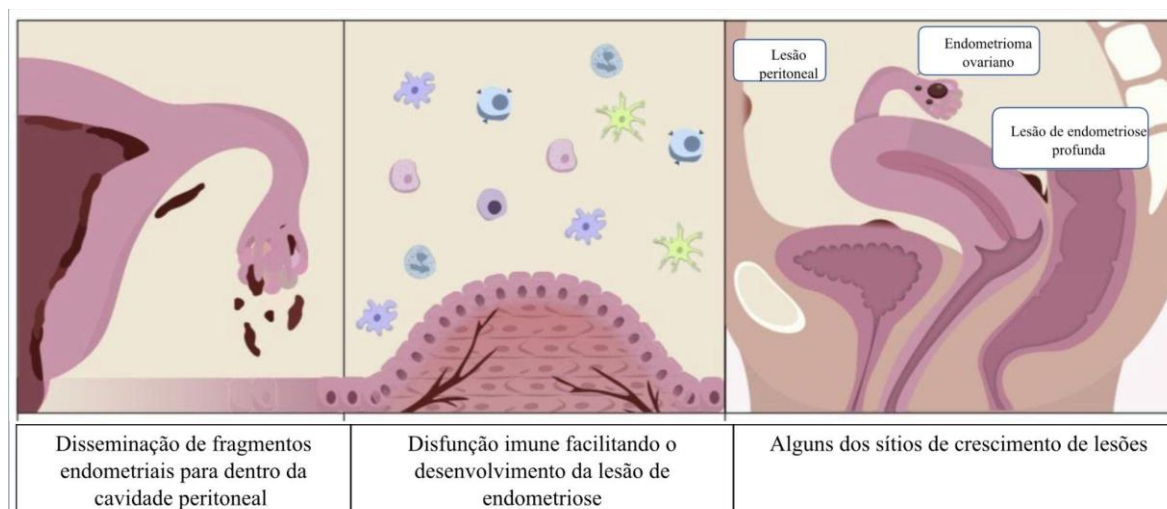
Infelizmente, permanece pouco compreendido como e por que a endometriose progride e se torna uma doença agressiva e capaz de destruir tecidos saudáveis. A literatura sugere que o stress oxidativo é um fator potencial e importante envolvido no estabelecimento e progressão das lesões (CARVALHO *et al.*, 2012). Apesar de ainda não estar claro quais são os eventos moleculares que estão envolvidos no progresso da doença, estudos demonstram que elevadas taxas no dano do DNA e reduzidas taxas no reparo do DNA estão presentes nos estágios mais avançados da

endometriose e que este fato indica instabilidade nas células com maior oxidação. Os resultados relacionam maior quantidade de stress oxidativo em fluido peritoneal, plasma e tecido endometriótico de mulheres portadoras desta doença (CARVALHO *et al.*, 2012)

Com intuito de explicar a patogênese da endometriose, inúmeras teorias foram criadas. Entretanto, nenhuma delas isoladamente é capaz de fundamentar todas as possíveis lesões causadas por esta doença. Particularmente, o conceito de disfunção imunológica tem ganhado atenção após a descoberta dos “caminhos imunes inatos-adaptativos” que facilitam o estabelecimento e persistência do tecido endometrial ectópico na cavidade peritoneal (SYMONS *et al.*, 2018).

É plausível que vários mecanismos, como fatores inflamatórios, imunidade desregulada, hormônios, fatores genéticos e epigenéticos, assim como fatores locais devam agir simultaneamente para causar a endometriose. Anormalidades endometriais pré existentes também devem favorecer a implantação e crescimento de células endometriais fora do útero, como biossíntese de esteroide anormal (hiperestrogenismo, resistência à progesterona, superexpressão de aromatase) e o aumento do potencial invasivo do endométrio (associado a neoangiogênese, neurogênese e perfil pró-inflamatório tecidual) (CHAPRON *et al.*, 2019). A Figura 4 é uma representação simplificada da patogênese da endometriose.

Figura 4. Patogênese da endometriose



Nota: tecidos endometrióticos viáveis encontram-se na cavidade peritoneal. A habilidade deste tecido de se implantar, proliferar, estabelecer suprimento vascular e se estabelecer ocasionando o surgimento de uma lesão endometriótica é facilitado pela disfunção imune que envolve tanto defeitos na imunovigilância contra células autólogas quanto da sobrecarga do sistema imune causada pela presença persistente de células endometriais no peritônio. Fonte: adaptado de Symons *et al.*, (2018).

2.6.1 Teorias do aparecimento do endométrio ectópico

Dentre as várias teorias que tentam explicar o aparecimento de células endometriais na cavidade peritoneal, pode-se citar:

- A. Menstruação retrógrada: teoria mais bem aceita; postula que, durante a menstruação, células endometriais viáveis refluem pelas trompas até a cavidade abdominopélvica. As células endometriais, então, encontram o peritônio e estão aptas a implantar-se e desenvolver-se, invadindo outros tecidos. Para a doença se desenvolver, estes fragmentos endometriais são patológicos e devem resultar de uma perturbação da programação endometrial ontogenética. A distribuição anatômica das lesões de endometriose é a principal evidência a favor da hipótese da menstruação retrógrada, juntamente com a observação de debris menstruais na cavidade peritoneal durante a menstruação. É relevante a presença de tecido endometrial viável no estabelecimento da lesão endometriótica, porém, esta teoria não explica os mecanismos responsáveis pela implantação do tecido endometrial ectópico ou pelo seu crescimento e desenvolvimento (CHAPRON *et al.*, 2019; SYMONS *et al.*, 2018);
- B. Metaplasia celômica: descrita em 1942 por Gruenwald; baseia-se no fato de o mesotélio celômico ser totipotencial e estar envolvido no desenvolvimento embriológico de várias estruturas do organismo. Aventa-se a possibilidade de que células mesoteliais possam sofrer metaplasia, espontânea ou induzida, tornando-se células endometriais, independentemente de sua localização. Estudos sugerem o provável papel da presença de disruptores endócrinos nesta transformação das células mesoteliais em endometriais (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021);
- C. Disseminação angiolímfática: esta teoria sugere que células endometriais podem cair nos vasos uterinos, sejam eles linfáticos e/ou sanguíneos, durante o período menstrual e serem transportadas para outros sítios, de forma similar ao que ocorre com os tumores. Ela explicaria a presença de endometriose em alguns lugares extrapélvicos, como linfonodos, pulmão, fígado e cérebro. Devido à raridade da incidência desta patologia nestes órgãos, é até possível que esta transação de células ocorra, mas certamente não é o mecanismo primário de propagação da doença e também explica os mecanismos

responsáveis pela implantação, crescimento e desenvolvimento do tecido endometrial ectópico (SYMONS *et al.*, 2018; CHAPRON *et al.*, 2019; ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021).

2.6.2 Alterações genéticas e epigenéticas na patogênese da endometriose

A possibilidade de relacionar a etiologia da endometriose a alterações genéticas origina-se no fato, já a muito tempo conhecido, que familiares de mulheres acometidas têm maior risco de desenvolver esta patologia do que a população geral. Estudos sugerem que a hereditariedade da endometriose seja de 50% e que o aumento no risco de desenvolver endometriose pode chegar a seis vezes para parentes de primeiro grau. Existe, portanto, uma base de suscetibilidade genética na ocorrência da endometriose (CHAPRON *et al.*, 2019; ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021).

Algumas regiões genômicas já foram estatisticamente associadas à endometriose e mutações somáticas foram reportadas em grande parte das lesões. A partir de estudos de associação genômica ampla (*GWAS - Genome-wide Association Study*) e da realização de meta-análises, foram identificadas e publicadas, até o presente momento, quatorze regiões genômicas (*loci*) associadas ao risco elevado de endometriose. Os *loci* identificados encontram-se, em sua maioria, localizados em íntrons, regiões intergenes ou regiões de controle da expressão gênica, e exercem seus efeitos regulando e influenciando a atividade transcricional dos seus próprios genes. Por isso, não há efeitos diretos dessas alterações gênicas na composição das proteínas, o que restringe a contribuição dessas variantes proteicas comuns na avaliação do risco de endometriose (ZONDERVAN *et al.*, 2018; FUNG; MONTGOMERY, 2018). Esses fatores genéticos de maior risco explicam somente cerca de 2% das variações observadas em todos os casos de endometriose e cerca de 5% das variações observadas nos casos de endometriose grave. Assim, presume-se que esses fatores ou mecanismos genéticos resultem de grande número de variações genéticas.

Por todos os motivos apresentados, os maiores desafios da atualidade relacionam-se à identificação ou entendimento dessas variações ou polimorfismos de nucleotídeos dentro das sequências regulatórias, em cada região genômica,

associados à endometriose, bem como à identificação precisa de quais genes são afetados por esses polimorfismos.

Epigenética consiste no estudo das mudanças hereditárias na expressão gênica que independem de mudanças na sequência primária do DNA. Os principais mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas, posicionamento de nucleossomos e pequenos segmentos de ácido ribonucleico (microRNAs). Diversos estudos investigaram, em comparação ao tecido endometrial eutópico, mudanças epigenéticas presentes nas lesões endometrióticas, tanto em pacientes com endometriose, quanto em pacientes clinicamente hígdas. A maioria desses estudos priorizou pesquisas de hipermetilação do DNA e o silenciamento de genes endometriais que normalmente são expressos durante a fase secretora do ciclo menstrual, como os genes das proteínas Hox-A10 e E-caderina e do receptor de progesterona. Poucos estudos investigaram os mecanismos epigenéticos de modificações da histona e dos microRNAs na endometriose. Os resultados preliminares, apesar das limitações dos referidos estudos, indicam influência epigenética na endometriose (FUNG; MONTGOMERY, 2018).

O progresso acerca da identificação de genes e vias biológicas que contribuem para a patogênese da endometriose é inegável e os avanços continuam, a fim de auxiliar no diagnóstico e tratamento desta nosologia. Mas, além da susceptibilidade genética, outros fatores presentes no microambiente peritoneal, como as respostas imunes inata e adaptativa, influenciam diretamente o desenvolvimento da endometriose.

2.6.3 Sistema imune na patogênese da endometriose

O microambiente no qual a lesão endometriótica se desenvolve é dinâmico e dominado por sinais inflamatórios, angiogênicos e endócrinos. Estas lesões são heterogêneas, possuindo componentes epiteliais, estromais, endoteliais e glandulares e células imunes, e exibem perfis imunoinflamatórios alterados quando comparadas com endométrio normal (SYMONS *et al.*, 2018).

Mulheres com endometriose possuem respostas imunes desreguladas, tanto inata quanto adaptativa, que resulta em um ambiente peritoneal inflamatório caracterizado por elevados níveis de componentes pró-inflamatórios, como macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B. Este

ambiente é caracterizado pela ativação das células da resposta imune inata e desregulação das células Treg (LE NXH *et al.*, 2021).

O perfil transcriptômico (conjunto completo de todo o RNA presente - RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs-) das alterações inflamatórias associadas nas lesões endometrióticas revelam expressão elevada de genes relacionados a recrutamento de células imunes, interação entre citocina-receptor de citocina, adesão celular e apoptose. Além disso, as lesões endometrióticas possuem um microambiente imune distinto, se assemelhando ao perfil inflamatório de tumores (SYMONS *et al.*, 2018).

2.6.3.1 Mecanismos do sistema imune inato e a endometriose

As populações celulares do sistema imune inato que estão predominantemente envolvidas na fisiopatologia da endometriose são neutrófilos, macrófagos, células NK e células dendríticas (SYMONS *et al.*, 2018).

- A. Neutrófilos: elevado infiltrado neutrofílico é observado no fluido peritoneal de mulheres com endometriose. Este aumento é, provavelmente, resultado de elevadas concentrações de substâncias quimiotáticas neutrofílicas presentes no plasma e fluido peritoneal, como a IL-8. Os neutrófilos podem ter um papel importante nos estágios iniciais de desenvolvimento das lesões endometrióticas (SYMONS *et al.*, 2018);
- B. Macrófagos: nas mulheres portadoras de endometriose, eles estão classicamente ativados (M1) e significativamente elevados no fluido peritoneal, no endométrio eutópico e nas próprias lesões. Funcionalmente, os macrófagos desempenham um papel crucial no desenvolvimento das lesões de endometriose e inflamação, pois possuem reduzida capacidade fagocitária, que está associada à reduzida expressão CD36, além de exibir ativação elevada da transcrição do fator pró-inflamatório fator nuclear- κ B, junto com aumento de expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β . A superexpressão de prostaglandina E2 (PGE2), achado comum nas mulheres com endometriose, pode também suprimir a atividade fagocítica dos macrófagos. Além disso, já foi documentado o aumento do número de macrófagos colocalizados com fibras nervosas nas lesões endometrióticas, o

que sugere que esta interação entre macrófagos e fibras nervosas, mediadas por estradiol, pode promover os sintomas algícos associados à endometriose. Finalmente, em locais onde há inflamação, os macrófagos possuem um papel chave no recrutamento de neutrófilos através da liberação de quimiocinas (TAKEBAYASHI *et al.*, 2015; SYMONS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2005);

- C. Células NK: já está bem estabelecido que, na endometriose, o microambiente peritoneal local suprime as atividades das células NK e que estas mesmas células exibem expressões aberrantes de vários receptores de superfície, prejudicando sua funcionalidade. No fluido peritoneal, a IL-6 reduz os componentes citolíticos das células NK ao modular a região 2 do Scr que contém a fosfatase tirosina 2 (SYMONS *et al.*, 2018) e o TGF- β 1 reduz a sua atividade citolítica. No tecido endometrial ectópico, as células estromais expressam intensamente a IL-15, que, por sua vez, inibe a atividade citolítica das células NK. A interação das células endometriais estromais com macrófagos produzem uma redução na citotoxicidade das células NK, possivelmente através do aumento da emissão de IL-10 e TGF- β (SYMONS *et al.*, 2018). Outro fato que também contribui para a tolerância imunológica do endométrio ectópico é o fato de as células NK de mulheres portadoras de endometriose apresentarem aumento da expressão de *killer immunoglobulin-like receptors* KIR e consequente diminuição da atividade citotóxica. Com isso, especula-se que as disfunções das células NK na endometriose contribuem para que as células endometriais ectópicas escapem do sistema imune (SYMONS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2000);
- D. Células Dendríticas (DC): o fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose contém elevada quantidade de células dendríticas mielóides BDCA1+ expressando receptores de manose. Estas células dendríticas são capazes de fagocitar debris de endométrio ectópico às custas de secreção de IL-6 e IL-1b, contribuindo para o perfil inflamatório observado na doença. Adicionalmente, a densidade entre as populações de DC imaturas (CD1a+) e maduras (CD83+) está alterada nos tecidos endometriais tóxico e ectópico nas pacientes com endometriose (SYMONS *et al.*, 2018).

Em relação aos biomarcadores circulantes sintetizados por essas células, há evidências crescentes de elevação acentuada de diferentes fatores solúveis, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), citocinas angiogênicas (leptina e CXCL-8), quimiocinas seletivas para linhagem macrófágica (CCL2 e CCL5), fatores de crescimento angiogênico (VEGF e proteína quinase 2 - CK2), enzimas, hormônios, espécies reativas do oxigênio e prostaglandinas, desencadeando inflamação intensa e imunomodulação desregulada na endometriose (SYMONS *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2018; KOBAYASHI *et al.*, 2009). A expressão do VEGF ocorre no estroma, epitélio glandular e macrófagos locais e exerce efeito sobre o recrutamento de células imunes para a lesão endometriótica, sugerindo regulação imune da angiogênese (GOTERI *et al.*, 2004). Também a leptina e a CXCL-8 estão potencialmente envolvidas na patogênese da endometriose. A CXCL-8 estimula o crescimento de células endometriais tópicas e ectópicas, provavelmente através da indução da produção de TNF- α e também correlaciona-se com a gravidade da doença (MALHOTRA *et al.*, 2012). No líquido peritoneal, TNF- α e IL-1 β podem contribuir para a adesão das células endometriais e são capazes ativar c-Jun N-terminal quinase (JNK), que regulam positivamente a expressão de citocinas inflamatórias (UZ *et al.*, 2011).

Biomarcadores associados à modulação de resposta imune inflamatória também estão associados à endometriose. Níveis elevados da expressão de IL-10, um potente modulador das respostas inflamatórias e da função das células imunes, foram observados na endometriose (PODGAEC *et al.*, 2010). Complementarmente, níveis elevados da expressão de TGF- β 1 induziram a secreção de IL-6 nas células do estroma endometrial e a fibrogênese pélvica. A IL-6 é uma das principais citocinas na cascata inflamatória na endometriose e sua elevação na cavidade peritoneal e no sangue periférico das pacientes correlaciona-se com a atividade da doença (SAITO *et al.*, 2011). Mais recentemente, concentrações elevadas de IL-33 foram observadas no soro e líquido peritoneal de mulheres com endometriose de infiltração profunda, indicando influência na tolerância dos macrófagos (MILLER *et al.*, 2017).

Por último, no contexto da imunidade inata, a proliferação celular está associada às alterações nos níveis de expressão de algumas proteínas anti-apoptóticas, como o fator BCL-6, e ao estresse oxidativo mediado por radicais livres altamente tóxicos, como o ferro livre. O ferro livre é um mediador proeminente e precoce da inflamação na endometriose, por meio da produção de espécies reativas

de oxigênio (ROS). As ROS induzem danos celulares e no DNA e aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios através da ativação do NF- κ B, induzindo, por exemplo, a ativação permanente do inflamassoma, com liberação continuada de IL-1 β , e em conjunto com as células e biomarcadores descritos acima, a ativação da imunidade adaptativa na endometriose (KOBAYASHI *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2011; YEOL *et al.*, 2015).

2.6.3.2 Mecanismos do sistema imune adaptativo e a endometriose

A endometriose é caracterizada pela atividade reduzida de células T citotóxicas, pela modulação da secreção de citocinas por células T auxiliares e pela produção de autoanticorpos pelos linfócitos B. Portanto, ambos os componentes da imunidade adaptativa (celular e humoral) estão envolvidos na fisiopatologia da endometriose (SYMONS *et al.*, 2018).

A. Imunidade celular, resposta regulada pelos linfócitos T

A imunidade celular pode ser categorizada em 7 subconjuntos, T_{H1}, T_{H2}, T_{H9}, T_{H17}, T_{H22}, Tregs e T_{FH}. Por causa da presença elevada de citocinas do tipo 2 no plasma e no fluido peritoneal das pacientes com endometriose, esta doença é caracterizada por possuir uma resposta imune predominantemente tipo TH2 (SYMONS *et al.*, 2018).

Na endometriose, os linfócitos T CD4⁺ (conhecidos como auxiliares ou *helper*), tanto Th1 que promovem a diferenciação das células CD8, quanto Th2 que induzem síntese de anticorpos, e os linfócitos T CD8 (conhecidos como citotóxicos) apresentam alterações na secreção das suas citocinas de perfil Th1: IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TNF- β ; e Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (KRALICKOVA; VETVICKA, 2015; RICCIO *et al.*, 2018).

Estudos que avaliaram linfócitos T em pacientes com endometriose mostraram razão maior de CD4/CD8 e aumento da concentração de cada subpopulação no líquido peritoneal dos pacientes, mas com redução relativa em células Th1. As lesões endometrióticas apresentaram maior concentração de linfócitos T, quando comparadas com o endométrio eutópico, mas com uma relação CD4/CD8 semelhante. Não houve alterações no sangue periférico. Lesões endometrióticas também mostraram maior fração de linfócitos quando comparadas ao endométrio

eutópico. O mecanismo de implantação das células endometriais ectópicas na cavidade peritoneal depende de macrófagos alterados. Essas células também produzem citocinas inflamatórias que recrutam e ativam células Th1 e Th2 (HO; WU; YANG, 1997; DMOWSKI; BRAUN, 2004; TAKAMURA *et al.*, 2015).

Células Th17 são linfócitos T que secretam IL-17, IL-21, IL-22 e que expressam o fator ROR γ t, sendo decisivas no desenvolvimento de reações autoimunes e alérgicas (LE NXH *et al.*, 2021). Foi demonstrado que a IL-17, citocina mais produzida pelas células Th17, está elevada no plasma e no fluido peritoneal das pacientes com endometriose e que ela pode contribuir para a progressão da doença, estimulando a produção de citocinas que induzem a angiogênese e a inflamação (SYMONS *et al.*, 2018; LE NXH *et al.*, 2021). O aumento das células Th17 no fluido peritoneal é proporcional à severidade da doença (SYMONS *et al.*, 2018).

Células Tregs são células imunossupressoras potentes que expressam o fator FOXP3 e exercem sua modulação no sistema imune através da produção de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β , as quais inibem a ativação das células T_H. Essas células estão naturalmente salientes no trato reprodutivo (LE NXH *et al.*, 2021). O papel dos Treg na fisiopatologia da endometriose continua impreciso e controverso, mas possivelmente possui atribuições na inflamação, angiogênese, proliferação tecidual e na invasão da lesão. Associações gerais têm sido feitas entre polimorfismo de FOXP3 (proteína com a função de ser a reguladora principal da via imune regulatória) e a endometriose. Em mulheres portadoras de endometriose, observa-se também reduzidos níveis de mediadores anti-inflamatórios das Tregs no plasma e elevada quantidade de células Treg no fluido peritoneal, além da presença destas mesmas células na lesão endometriótica. Esta evidência sugere uma função supressora local das Tregs no sítio de desenvolvimento da doença. *In vitro*, as células Tregs são capazes de promover, junto com a ação de IL-10 e TGF- β , um aprimoramento da proliferação e invasão das células estromais endometriais. É cada vez mais evidente que um efeito sinérgico de vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células endometriais, células endoteliais e células Tregs com fatores solúveis, como citocinas e quimiocinas, são facilitadores deste estado invasivo, proliferativo e pró-inflamatório, onde a lesão pode aderir e crescer. Até o momento, mesmo com todos estes indícios, não se demonstrou relação de causa e efeito na

doença e estabelecer se a resposta imune Treg está envolvida, e como ela está vinculada, é puramente especulativo (SYMONS *et al.*, 2018; LE NXH *et al.*, 2021).

O balanço entre Treg/Th17 é crucial para a manutenção da homeostase do sistema imune e o seu desequilíbrio já foi caracterizado em inúmeras doenças, entretanto o desenho das populações de células Tregs e Th17 nas pacientes acometidas com endometriose ainda não foi estabelecido (LE NXH *et al.*, 2021).

B. Imunidade Humoral, resposta regulada pelos linfócitos B

A confirmação da presença de anticorpo anti-endometrial no plasma e no fluido peritoneal das pacientes com endometriose permite a caracterização desta doença como autoimune e intensa investigação vem sendo realizada para entender melhor o papel dos linfócitos B neste contexto. Dados prévios avaliando pacientes com endometriose demonstraram depósitos de IgG e complemento no endométrio, diminuição do complemento sérico e presença de anticorpos anti-endometrial no soro, sugerindo uma resposta autoimune com o consumo de complemento pelo complexo antígeno-anticorpo (WEED; ARQUEMBOURG, 1980; WILD; SHIVERS, 1985; ODUKOYA; BANSAL; COOKE, 1996). Além de produzir anticorpos, outras funções do linfócito B incluem a produção de diferentes citocinas, como IL-6, IL-17 e fator estimulador de macrófagos granulócitos (GM-CSF), sendo estas capazes de modular células imunes (como os linfócitos T) e perpetuar a inflamação crônica. A literatura até o momento é discordante sobre o incremento de linfócitos B e sua ativação e sobre o aumento de BCL-6 (proteína necessária para o desenvolvimento do linfócito B associada a resistência à progesterona e infertilidade) nas lesões endometrióticas. É necessário entender completamente o papel dos linfócitos B no microambiente da lesão endometriótica e sua interação com demais células imunes (SYMONS *et al.*, 2018).

2.6.3.3 Mediadores inflamatórios na endometriose

Fatores solúveis aumentados, como autoanticorpos, citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, enzimas, hormônios, prostaglandinas e ROS têm sido descritos no sangue, líquido peritoneal e lesões de pacientes com endometriose (RICCIO *et al.*, 2018). Adicionalmente, várias citocinas: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-33, e TNF- α , quimiocina como CXCL-8 e fatores de crescimento: fator de crescimento

transformador (TGF)-beta, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento do endotelial vascular (VEGF) estão significativamente aumentados na endometriose (RICCIO *et al.*, 2018; KAYISLI; MAHUTTE; ARICI, 2002).

2.6.3.4 Eixo imunoangiogênico na endometriose

A angiogênese é um processo integrante da fisiopatologia da endometriose necessário para permitir a sobrevivência e crescimento do tecido endometrial ectópico. A presença de lesões no peritônio possui profundo efeito no microambiente, contribuindo diretamente com a secreção de VEGF no fluido peritoneal ou indiretamente, ao impulsionar uma reação imune que promove um ambiente inflamatório e pró-angiogênico. Nas lesões endometrióticas humanas, a expressão de VEGF está localizada no estroma endometrial, no epitélio glandular e no infiltrado de macrófagos. Os achados em modelos animais sugerem que as células imunes envolvidas na implantação e desenvolvimento das lesões endometrióticas criam um microambiente pró-angiogênico na endometriose (SYMONS *et al.*, 2018).

2.6.3.5 Interação imunoendócrina na endometriose

A biossíntese local de estradiol pela lesão endometriótica em conjunto com a acentuada inflamação na cavidade peritoneal promovem um microambiente imunoendócrino aberrante, ideal para a sobrevivência do tecido endometrial ectópico e seu crescimento (SYMONS *et al.*, 2018).

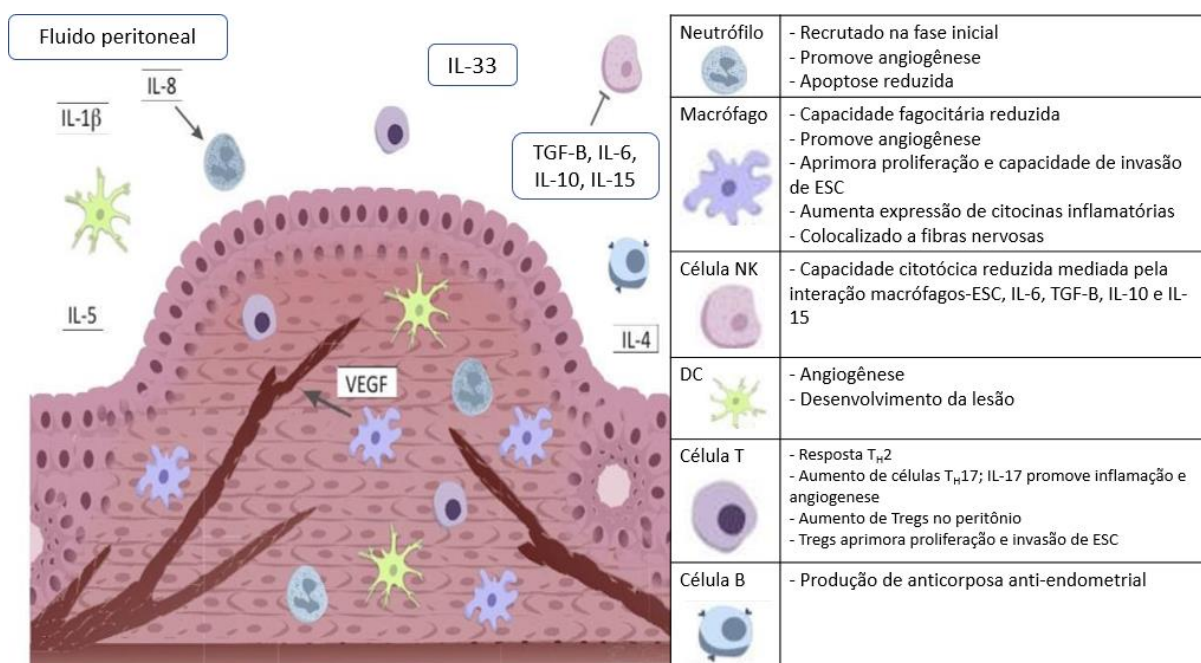
A biodisponibilidade de estradiol é maior por causa da aromatização local dos andrógenos circulantes pelas células estromais que compõem a lesão.

O estrogênio exerce suas ações nos receptores de estrogênio (RE) nuclear, ERa e ERb. Na endometriose, tanto a expressão quanto a sinalização destes receptores estão alteradas. O ERb promove o crescimento da lesão ectópica através do reforço das atividades proliferativas e redução dos sinais de apoptose, além de atuar na ativação do receptor NOD-like inflammasome inato, perpetuando a produção de IL-1b e crescimento da lesão.

A resistência a progesterona apresentada pelo endométrio de mulheres portadoras de endometriose potencializa a sobrevivência do tecido ectópico e a manutenção da inflamação crônica, sendo explicada por 2 fatores: (i) pela redução do número de receptores de progesterona; (ii) pela metilação anômala das células estromais, causando deficiência e supressão nos receptores de progesterona (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021).

A Figura 5 ilustra, de maneira esquemática, o microambiente de uma lesão endometriótica, com as interações entre os mais variados tipos celulares e mediadores do sistema imune.

Figura 5. Microambiente da lesão endometriótica

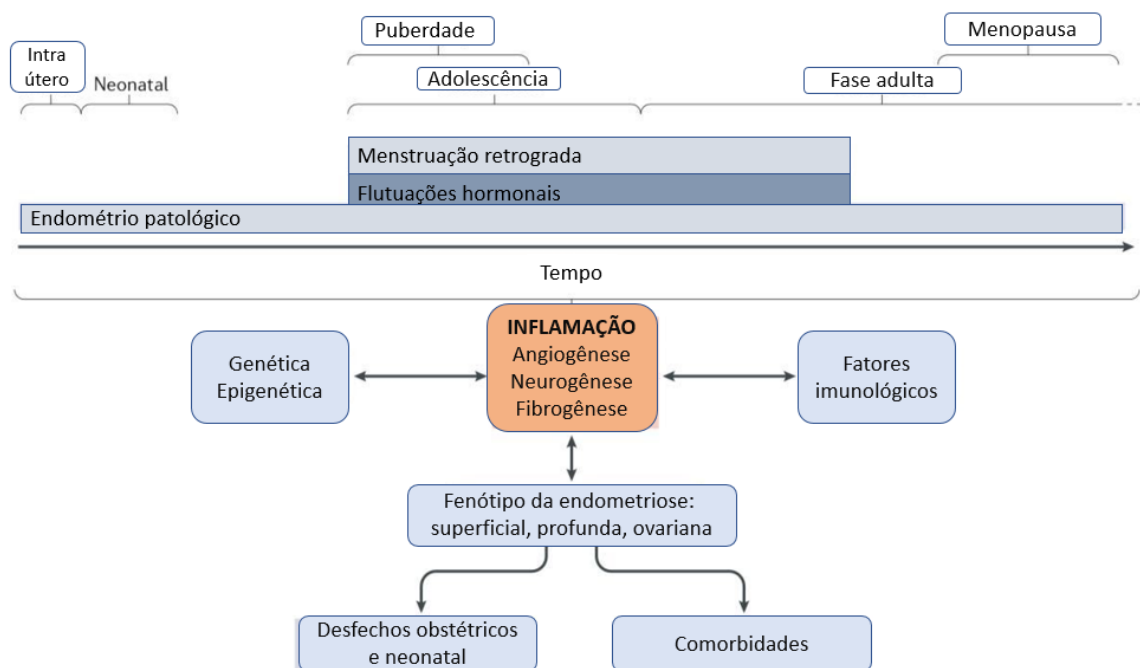


Representação esquemática do microambiente imune de uma lesão endometriótica. Lesão endometriótica consiste em células epiteliais, estromais e endometriais interagindo com inúmeras populações de células imunes. No fluido peritoneal, células imunes como macrófagos, neutrófilos, células NK, DC e linfócitos T e B estão presentes com inúmeras citocinas, quimiocinas, fator angiogênico e alarminas. Fonte: adaptado de Symons *et al.*, (2018).

Considerando o desafio do entendimento de todos esses processos resumidos na Figura 6, neste trabalho foram estudadas as correlações entre as manifestações clínicas, os exames imagiológicos, os achados cirúrgicos, a expressão de biomarcadores imunológicos e o acompanhamento ambulatorial em uma amostra

representativa da população de mulheres portadora de doença ginecológica benigna com o propósito de fornecer subsídios para a identificação de biomarcadores relacionados à detecção de endometriose assim como sua progressão e seu fator prognóstico.

Figura 6. O curso da endometriose



O desenvolvimento de endometriose pode ocorrer em qualquer fase da vida. Na vida intrauterina e período neonatal, a exposição a características maternas, fatores ginecológicos e padrões de alimentação podem contribuir para deficiências no padrão ontogenético endometrial, o que resultaria em um endométrio patológico. A partir da puberdade, a presença de endométrio anormal na cavidade peritoneal pode gerar lesões ectópicas. Estas lesões são sensíveis à variações hormonais relacionadas tanto à função ovariana quanto a gravidez e tratamentos. A menopausa geralmente cursa com quiescência da doença. No curso da endometriose, processos como inflamação, angiogênese, neurogênese e fibrogênese estão envolvidos na origem e manutenção das lesões. Todo este processo é controlado e influenciado por fatores genéticos, epigenéticos e imune. Fonte: adaptado de Chapron *et al.*, (2019).

3. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença de extrema relevância e importância para a saúde pública mundial. É uma patologia da mulher moderna, cuja prevalência é significativa e crescente, com estimativa de acometimento de 10% da população feminina no menacme, o que representa mais de 200 milhões de indivíduos com endometriose ao redor do mundo, sendo aproximadamente 7 milhões de brasileiras (ZONDERVAN *et al.*, 2020).

A endometriose tem efeito importante na qualidade de vida das mulheres portadoras, com consequências negativas em suas atividades diárias, sexualidade, função reprodutiva, relações pessoais, trabalho e estudo, levando a menor capacitação profissional e perda de produtividade laboral (CHAPRON *et al.*, 2019; DUNSELMAN *et al.*, 2013; ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021). Além do prejuízo individual, a endometriose é considerada um fardo econômico devido aos elevados custos oriundos de seu diagnóstico, tratamento e impacto na produtividade das pacientes acometidas. Este somatório atinge cifras de dezenas de bilhões de dólares anualmente.

A endometriose é uma doença desafiadora tanto para estabelecer diagnóstico quanto no seu manejo (CHAPRON *et al.*, 2019). O diagnóstico padrão-ouro é obtido com a combinação da realização de laparoscopia com identificação macroscópica de lesões endometrióticas e verificação histopatológica de glândulas e/ou estroma endometrial ectópico nos tecidos ressecados, o que exige um método invasivo, de alto-custo e pouco acessível para seu estabelecimento. Além disso, estudos demonstram um grande atraso para realizar o diagnóstico de endometriose, demorando, em média, de 6 a 10 anos (DUNSELMAN *et al.*, 2013).

É evidente a complexidade da patogênese da endometriose e ainda existem pontos cruciais desconhecidos para melhor entendimento de seu desenvolvimento. A existência de disfunções imunológicas associadas a esta doença é inegável e sua melhor compreensão poderá contribuir para o desenvolvimento de modalidades de diagnóstico e instrumentos de acompanhamento prognóstico não invasivos.

Apesar da existência de pesquisas em biomarcadores para diagnóstico e acompanhamento da doença, nenhum foi consolidado e liberado para aplicação

clínica. Devido a este fato, há uma importante janela de oportunidade atualmente aberta para seleção de novos biomarcadores relacionados à imunopatogênese da endometriose.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Selecionar biomarcadores imunológicos para o diagnóstico e monitoramento da endometriose.

4.2 Objetivos específicos

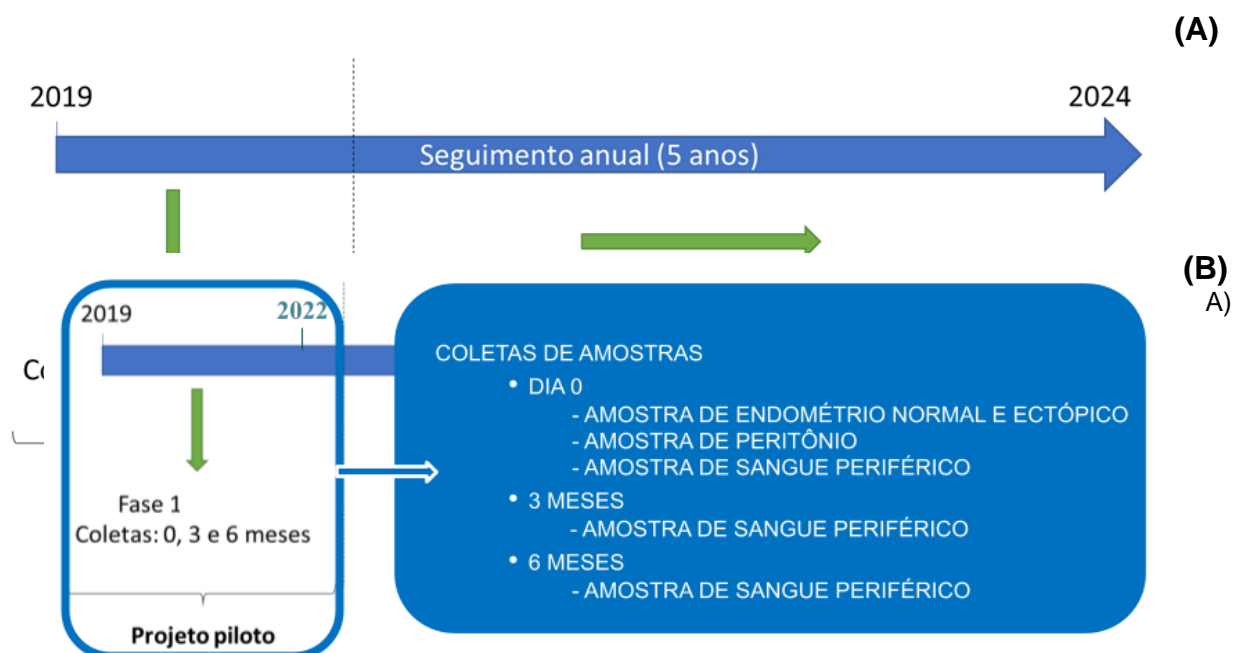
1. Determinar o estadiamento da endometriose de acordo com a localização, extensão e profundidade da doença;
2. Comparar os aspectos histopatológicos dos endométrios eutópico e ectópico;
3. Identificar marcadores no sangue periférico que estejam associados com a resposta inflamatória em diferentes estágios da endometriose;
4. Correlacionar os biomarcadores imunológicos com os aspectos clínicos e radiológicos.

5. POPULAÇÃO E METODOLOGIA

5.1 Delineamento metodológico e aspectos éticos do estudo

Trata-se do Projeto Piloto ou Fase 1 do Estudo Longitudinal de Biomarcadores em Endometriose (ELBE), que é um estudo primário, unicêntrico, observacional e de caráter longitudinal, realizado no Instituto René Rachou / FIOCRUZ Minas e no Hospital Felício Rocho. A Figura 7 ilustra o delineamento metodológico do estudo, que foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou / FIOCRUZ Minas e Hospital Felício Rocho, sob registro C.A.A.E. 13936619.7.0000.5091. Todas as participantes do estudo, após convite e aceite em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Figura 7. Delineamento metodológico do Projeto piloto dentro do ELBE



Delineamento inicial completo do ELBE, no qual 1ª etapa ou Fase 1 corresponde ao primeiro ano do estudo, dedicado à padronização dos protocolos clínico e laboratoriais, com coletas de amostras previstas para as datas de 0 (zero), três e seis meses. A 2ª etapa ou Fase 2 que condiz com os quatro anos seguintes, dedicados ao acompanhamento anual das participantes, obedecendo os protocolos clínico e laboratoriais definidos na Fase 1. B) Delineamento detalhado da Fase 1 do ELBE, com reajustes necessários como consequência da pandemia. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 População do estudo

Foram incluídas 61 participantes no estudo, provenientes do Núcleo Integrado de Pesquisa e Tratamento da Endometriose (NIPTE) do Hospital Felício Rocho (HFR), segundo os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

5.2.1 Critérios de inclusão

1. Foram incluídas no grupo “Endometriose Não Grave (ENG)” do ELBE os casos das participantes selecionadas com diagnóstico de endometriose nos estágios I (mínimo), II (leve) ou III (moderada) de acordo com a classificação da ASMR.
2. Foram incluídas no grupo “Endometriose Grave (EG)” as participantes com diagnóstico de endometriose no estágio IV (severo) de acordo com a classificação da ASMR ou com lesões endometrióticas extragenital.
3. Foram incluídas no grupo “Controle” do ELBE as participantes com diagnóstico de massa anexial benigna, leiomioma uterino, sangramento uterino anormal ou esterilização cirúrgica.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do ELBE as participantes que se enquadraram nos seguintes critérios de exclusão:

- a) Gravidez;
- b) Amamentação;
- c) Suspeitas clínicas de inflamação, infecção ou malignidade em qualquer sítio anatômico do organismo.

5.3 Coleta dos dados clínicos

Durante a consulta médica ginecológica na Unidade de Saúde da Mulher do HFR, os dados clínicos das participantes foram registrados em uma ficha clínica com detalhamento de tópicos relevantes para avaliação global e específica da mulher. Os parâmetros pormenorizados foram: dor pélvica, infertilidade, dor ao coito, dor menstrual, realização de tratamento (cirúrgico ou clínico) prévio, disfunção sexual, história pregressa, história familiar, história gineco obstétrica, achados imagiológicos

do monitoramento (US especializado para endometriose e/ou RM da pelve) e alterações no exame físico, como a presença de pontos de gatilho, mobilidade uterina, sensibilidade uterina e identificação de massa ou nodulação pélvica.

5.4 Análise histopatológica do endométrio

As biópsias de endométrio foram mantidas em formaldeído 10% (Êxodo científica, Nova Veneza, SP, Brasil) por 24 horas a 72 horas e foram então submetidas ao processamento histológico utilizando o Processador Automático de Tecidos Modelo PT05 (Lupetec, São Carlos, SP, Brasil). Na etapa de desidratação, as amostras foram imersas em formaldeído 10% por uma hora, seguido de incubação em álcool etílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) em diferentes concentrações – 70% por uma hora, 95% por uma hora e 99,5% por uma hora. A etapa de diafanização foi realizada mantendo as amostras imersas em acetato de N-butila P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil) por uma hora, e xileno P.A. (NEON, Suzano, SP, Brasil) por três horas. A infiltração por parafina líquida (Grupo Erviegas/Easypath, São Paulo, SP, Brasil) foi realizada à 56° C, por duas horas.

As amostras foram inseridas em bloco de parafina, seccionadas em cortes de espessura de quatro micrômetros, com o auxílio de um micrótomo modelo Leica RM2125RT (Leica Biosystem, Wetzlar, He, Alemanha), e montadas em lâminas histológicas para realização da análise microscópica histopatológica

A análise histopatológica abordou características da fase do ciclo, do epitélio e do estroma. A fase do ciclo foi classificada em proliferativa ou secretora. As características analisadas no epitélio das glândulas foram presença ou ausência de epitélio colunar, mitose epitelial, hemorragia epitelial (presença de sangue no lúmen da glândula) e foco inflamatório (presença de polimorfonucleares na glândula). As características analisadas no estroma das glândulas foram presença ou ausência de mitose no estroma, hemorragia no estroma (presença de sangue no estroma), foco inflamatório (presença de polimorfonucleares no estroma periglandular) e decidualização do estroma. Adicionalmente, foram analisadas as presenças de células linfóides e de macrófagos nas seguintes respostas: 0 ou ausente, 1 ou focal (+), 2 ou multifocal (++) e 3 ou difuso (+++). A categorização possibilitou ordenação das variáveis de acordo com a presença ou quantidade da característica semi-

quantificada, variando de 1 ou leve ou uma cruz (+) até 3 ou acentuado ou três cruces (+++).

5.5 Detecção de biomarcadores imunológicos no sangue periférico

Para determinar os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, foram utilizadas amostras de sangue periférico previamente coletadas e armazenadas em temperatura ambiente por 24 a 96 horas. A quantificação dos biomarcadores foi realizada por meio do kit “Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex” (Bio-Rad Laboratories), que emprega uma mistura de 27 esferas magnéticas, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humano. Essa metodologia permitiu a avaliação simultânea de 27 biomarcadores no mesmo ensaio (Tabela 1), empregando pequenos volumes de amostra. Resumidamente, amostras de plasma foram transferidas, em volume de 300 µL, para microtubos, seguido de centrifugação a 1.400 rpm a 18°C por 5 min. Na sequência, houve transferência de 90 µL do sobrenadante para placas de fundo chato que continham 50 µL dos padrões de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humano diluídos seriadamente com diluente “Assay Buffer” (reagente presente no *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex*), além de 50 µL dos “Quality Controls” 1 e 2 e 50 µL de diluente “Assay Buffer” (“Background”). Em seguida, a cada poço, foram adicionados 25 µL da mistura de esferas magnéticas conjugadas aos anticorpos monoclonais.

Tabela 2. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no sangue periférico

Citocinas	IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-12p70, IFN-γ, IL-15 e IL-17
Quimiocinas	CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10
Fatores de crescimento	FGF-basic, PDGF-BB, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7

Fonte: Elaborado pelo autor.

As placas foram seladas e incubadas *por* 18 h, a 4°C sob agitação (500±50 rpm). Após, as placas foram lavadas com 200 µL de *Wash buffer* 1x empregando o suporte magnético. Em seguida, foram adicionados 25 µL de anticorpo de detecção e

depois de 1 h de incubação foram adicionados 25 μ L de reagente de revelação (estreptavidina conjugada ao fluorocromo ficoeritrina-PE), a cada poço. Seguindo incubação de 30 minutos, as placas foram novamente lavadas com 200 μ L de *Wash buffer* 1x, foram adicionados 150 μ L do reagente *Sheath fluid* e seguiu-se leitura das amostras no equipamento Bio Plex 200, conforme recomendações do fabricante. A análise dos dados foi realizada no programa Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A aquisição e análise dos dados foram realizados na Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR – FIOCRUZ/Minas.

5.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL. Para comparar a expressão dos biomarcadores nos diferentes grupos de diagnóstico e analisar a relação entre as variáveis qualitativas e quantitativas, foram utilizados os testes Z, Qui-quadrado, correlação linear de Spearman (dados não paramétricos) ou de Pearson (dados paramétricos) nos softwares PRISM 8, MINITAB 17 e MATLAB. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. Para estabelecer modelos estatísticos preditivos da relação entre os biomarcadores imunológicos e os estágios da endometriose, foi utilizada a análise de regressão logística multinomial. Esta análise foi conduzida com o programa VGAM do software estatístico R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>).

6. RESULTADOS

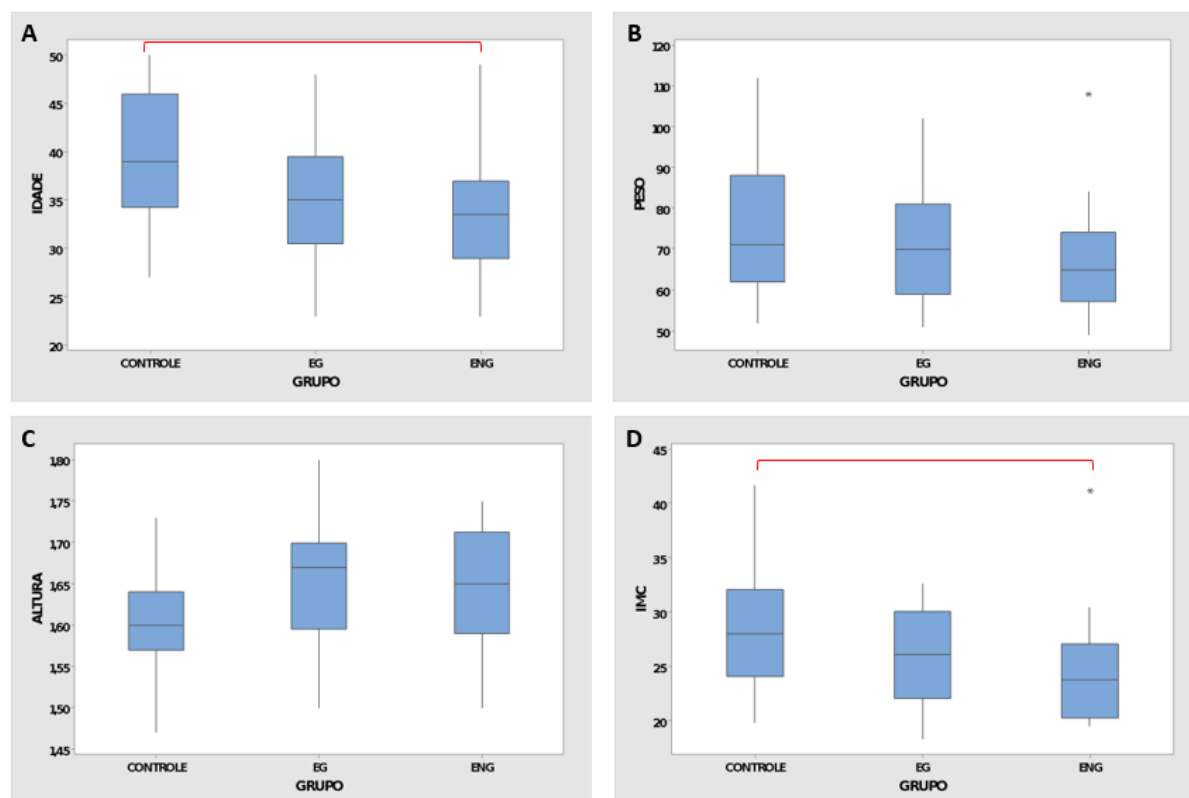
A apresentação dos resultados desse estudo, que avaliou 61 participantes com idade média de 35,7 anos, variando de 23 a 50 anos, encontra-se organizada em três partes. A primeira é destinada às descrições das características clínicas das participantes. A segunda é dirigida aos aspectos histopatológicos do endométrio. Já a terceira, é reservada aos resultados da quantificação de quimiocinas, citocinas inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento presentes no sangue periférico e às análises estatísticas multivariadas.

6.1 Características clínicas

A escolaridade das participantes foi avaliada e fracionada em “ensino fundamental”, “ensino médio” e “ensino superior”. Foi visto que 8,2% (n= 5) das participantes possuíam apenas o ensino fundamental, 29,51% (n=18) cursaram o ensino médio e que 62,3% (n=38) detinham ensino superior. Em relação ao estado civil, 68,85% (n= 42) das participantes eram casadas, 3,28% (n=2) eram divorciadas, 26,23% (n= 16) eram solteiras e apenas 1,64% (n=1) eram viúvas. A análise estatística comparando os grupos não detectou diferença significativa entre eles nestes parâmetros.

A idade, peso, altura e índice de massa corporal (IMC) das participantes encontram-se representados na Figura 8.

Figura 8. Idade, peso, altura e índice de massa corporal (IMC) das participantes nos subgrupos do ELBE



O eixo X corresponde aos subgrupos do estudo (Controle, Endometriose Grave (EG) e Endometriose Não Grave (ENG), enquanto o eixo Y relaciona-se, respectivamente, com a idade (A), peso (B), altura (C) e IMC (D) das participantes. Ao comparar a idade do grupo Controle com o grupo ENG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,007$). Ao comparar o IMC do Controle com ENG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelas linhas conectoras em vermelho. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos para peso e altura. O * indica a presença de *outlier*. Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da idade das participantes por subgrupos demonstrou que as participantes do grupo Controle tinham idade média maior do que as participantes portadoras de endometriose, alocadas tanto no grupo ENG, quanto EG. As participantes do grupo Controle tinham entre 27 e 50 anos, com mediana de 39 anos. Já as participantes portadoras de endometriose tinham entre 23 e 49 anos com mediana de 33,5 no ENG e 23 a 48 anos no EG, com mediana de 35 anos.

O índice de massa corporal (IMC) foi explorado, assim como seus parâmetros individualmente. O peso mínimo apresentado pelas participantes foi de 49 quilos (kg) e o máximo foi 112 kg, com mediana de 68,5 Kg. A altura mínima foi de 1,47 metro (m) e a máxima de 1,80 m, com mediana de 1,64 m. A análise estratificada pelos

subgrupos do peso e da altura encontrou valores semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas entre eles. O menor valor de IMC apresentado pelas participantes foi de 18,29 e o maior foi de 41,64. O estudo pormenorizado deste dado revela que: (i) no grupo Controle, o valor mínimo foi 19,81, o valor máximo foi 41,64 e a mediana foi 27,99; (ii) no grupo ENG, o valor mínimo foi 19,47, o valor máximo foi 41,15 e a mediana foi 23,73; (iii) no grupo EG, o valor mínimo foi 18,29, o valor máximo foi 32,6 e a mediana foi 26,09.

A investigação dos sinais e sintomas apresentados pelas participantes ocorreu com perguntas amplas seguidas de questionamentos direcionados. As manifestações investigadas foram: dismenorreia, dispareunia, dor pélvica crônica, infertilidade, sintomas intestinais, sintomas urinários, dor após a relação sexual, distensão abdominal, dor abdominal e dor cíclica.

A dismenorreia é recorrente e está presente em 38 (63,3%) participantes deste estudo, sendo 32 delas portadoras de endometriose (16 participantes do grupo ENG e 16 do grupo EG). Como observado na Tabela 3, a prevalência deste sintoma é superior nas mulheres acometidas pela endometriose, independentemente de sua severidade.

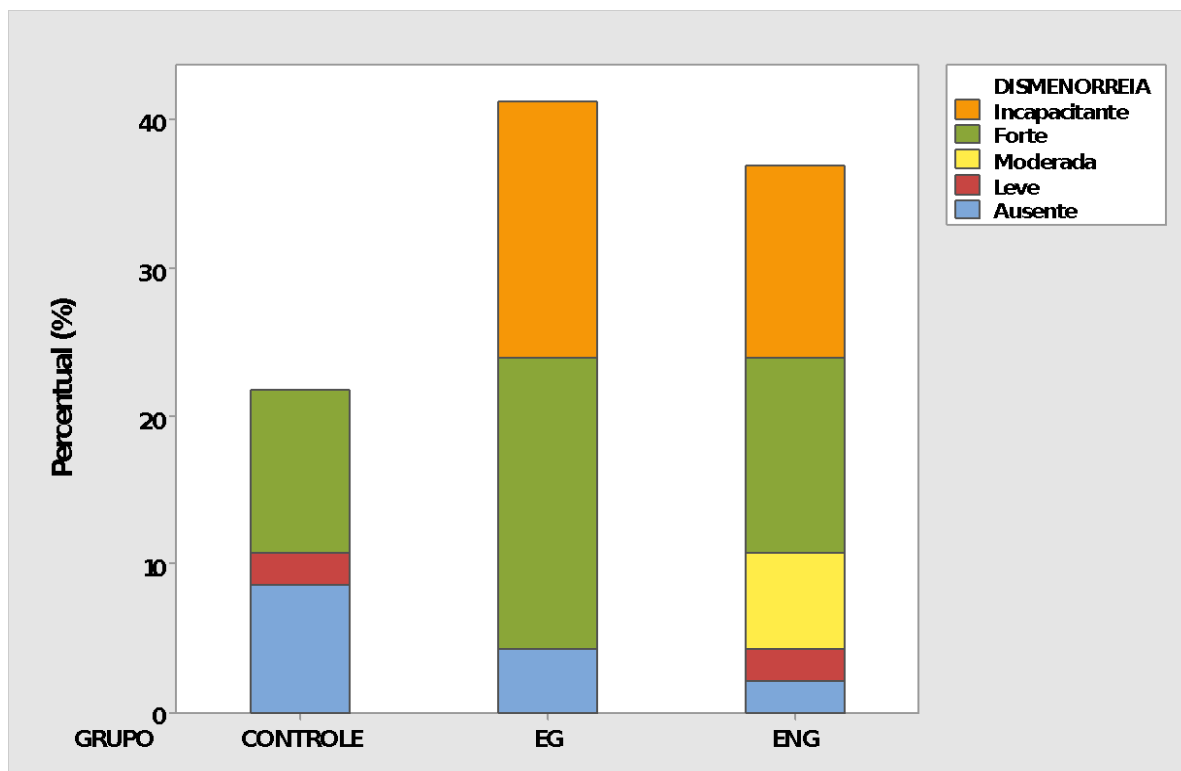
Tabela 3. Prevalência de dismenorreia no ELBE

GRUPO	Ausente		Presente		Total	
	n	%	n	%	n	%
CONTROL						
E	13	68,42	6	31,58	19	100,00
EG	5	23,81	16	76,19	21	100,00
ENG	4	20,00	16	80,00	20	100,00
Total	22	36,67	38	63,33	60	100,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

A intensidade da dismenorreia foi pormenorizada em ausente, leve, moderada, forte e incapacitante. A maioria das mulheres portadoras de endometriose classificou este sintoma como forte ou incapacitante, enquanto a maior parte das mulheres do grupo controle o classificou como ausente ou leve. Estes resultados estão representados na Figura 8.

Figura 9. Intensidade da dismenorrea nas participantes do ELBE



O eixo X corresponde aos subgrupos do estudo (Controle, Endometriose Grave (EG) e Endometriose Não Grave (ENG)) enquanto o eixo Y relaciona-se com o percentual (%) de cada categoria da intensidade da dismenorrea. Ao comparar as categorias de intensidade forte e incapacitante dos grupos EG e ENG com o grupo Controle, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,002$). Fonte: Elaborado pelo autor.

A dispareunia profunda foi uma manifestação vigente em 61,9% ($n=13$) das participantes do grupo EG, 63,16% ($n=12$) do grupo ENG e em apenas 15,79% ($n=3$) do grupo Controle. Ao estratificar o sintoma por sua intensidade, observou-se que a maioria das mulheres (62,07%) a classificava como intensa e houve a detecção de disfunção sexual, caracterizada como alteração de orgasmo e/ou libido, em aproximadamente 40% das participantes. A Tabela 4 representa os resultados encontrados sobre a dispareunia.

Tabela 4. Prevalência de dispareunia no ELBE

GRUPO	Ausente		Presente		Total	
	n	%	n	%	n	%
CONTROL						
E	16	84,21	3	15,79	19	100,00
EG	8	38,10	13	61,90	21	100,00
ENG	7	36,84	12	63,16	19	100,00
Total	31	52,54	28	47,46	59	100,00

Nesta análise encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,004$). Fonte: Elaborado pelo autor.

A dor pélvica crônica (DPC), dor localizada na região pélvica com mais de 6 meses de duração que pode ter ou não relação com o período menstrual, também manifesta-se mais comumente entre as mulheres portadoras de endometriose. Dentre as participantes do ELBE, a DPC estava presente em 31 (50,82%) mulheres, sendo 15 delas do grupo EG, 10 do grupo ENG e apenas 6 do grupo Controle, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Manifestação de DPC no ELBE

GRUPO	Ausente		Presente		Total	
	n	%	n	%	n	%
CONTROL						
E	14	70,00	6	30,00	20	100,00
EG	6	28,57	15	71,43	21	100,00
ENG	10	50,00	10	50,00	20	100,00
Total	30	49,18	31	50,82	61	100,00

Nesta análise encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). Fonte: Elaborado pelo autor.

A infertilidade está presente em 20% ($n=12$) das participantes, acometendo 1 participante do grupo Controle (5%), 6 participantes do grupo EG (28,57%) e 5 participantes do grupo ENG (26,32%).

Dentre os sintomas intestinais, foram avaliadas a presença de dor ao evacuar, sangue nas fezes, sensação de evacuação incompleta e tenesmo. Já nos sintomas urinários, foram aferidas a existência de disúria, dificuldade em iniciar a micção, hematúria, incontinência urinária e sensação de diurese incompleta. Para todas essas manifestações intestinais e urinárias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos.

A distensão abdominal foi relatada por poucas participantes, acometendo apenas 13,11% ($n=8$) das participantes, sendo todas elas portadoras de endometriose, com 5 participantes do grupo EG e 3 do grupo ENG. Esta diferença também não foi estatisticamente significativa.

Este estudo identificou a manifestação de dor abdominal em 21,31% ($n = 13$) das participantes, com distribuição semelhante pelos grupos. Tanto a dor após a relação sexual quanto a presença de dor cíclica foram relatadas apenas por mulheres

portadoras de endometriose. Nenhuma participante do estudo acusou a existência de dor no ombro.

Os resultados da aplicação da escala subjetiva de dor nas participantes do ELBE encontram-se na Tabela 6. Foram observadas pontuações médias de 7,55 e 7,40 nas escalas das participantes dos grupos ENG e EG, respectivamente. Essas médias foram distantes e significativamente diferentes ($p = 0,001$) da pontuação média de 2,20 das participantes do grupo Controle.

Tabela 6. Escala subjetiva de dor nas participantes do ELBE

GRUPO	Média	Desvio padrão	Escore mediano (variação de 1 a 10)
CONTROLE	2,20	3,25	0
ENG	7,55	2,0	8
EG	7,40	3,0	8

Nesta análise encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$).

A história ginecológica e obstétrica das participantes também foi investigada. A idade da menarca das participantes variou de 8 a 17 anos, com mediana de 12, com distribuição semelhante nos grupos, e o ciclo menstrual é regular na maioria das participantes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a número de gestações, número e via de partos, bem como a ocorrência de aborto, com ou sem a necessidade de curetagem. Mais da metade das participantes deste estudo possuem desejo reprodutivo, sendo. A história familiar de endometriose foi investigada e apenas 5 participantes relataram possuir parentes com esta patologia, sendo 2 do grupo EG e 3 do grupo ENG.

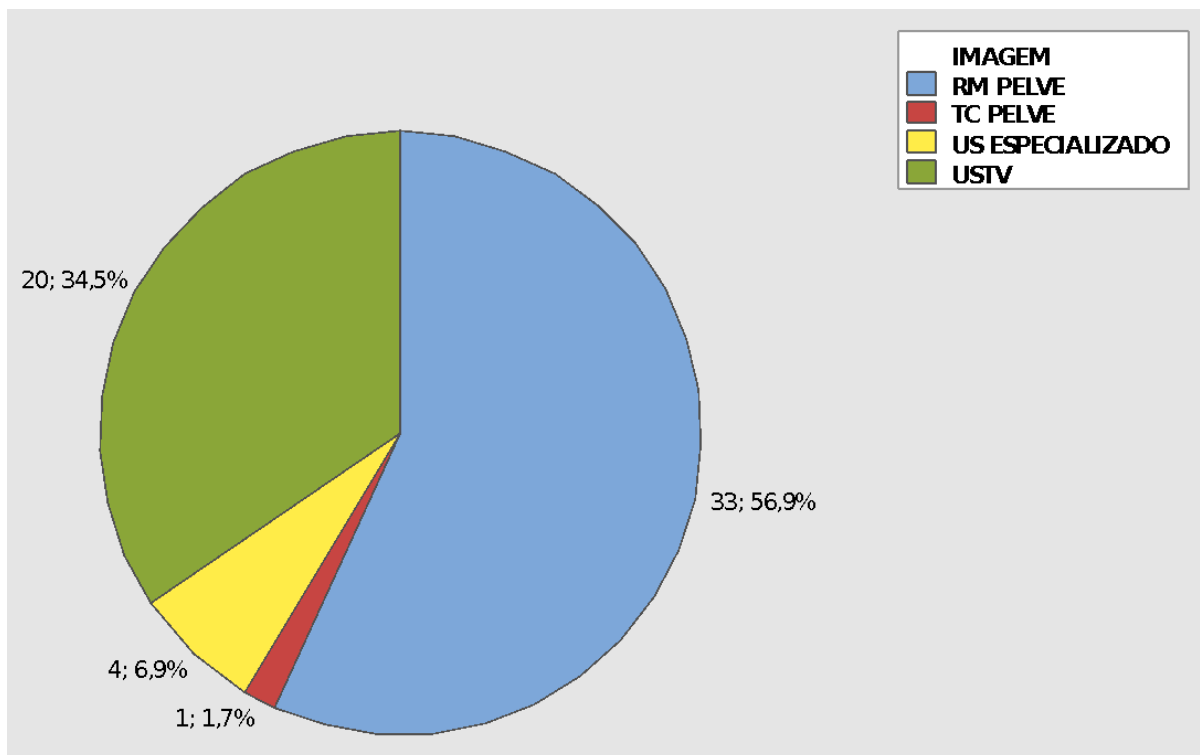
O histórico de tratamentos considerado pelo estudo foi o bloqueio ovariano hormonal e o tratamento cirúrgico prévio das lesões de endometriose. O bloqueio ovariano foi realizado por 49,18% ($n = 30$) das participantes em momento anterior ao estudo, presente em 40% ($n=8$) do grupo controle, 52,38% ($n=11$) do grupo EG e 55% ($n= 11$) do grupo ENG. Verificou-se que, dentre as participantes que não realizaram o bloqueio ovariano hormonal, 1 participante fez uso de dispositivo intrauterino (DIU) hormonal. O bloqueio ovariano está sendo realizado por 18 mulheres (29,51%), sendo

apenas 4 do grupo Controle e 7 do grupo EG (33%) e 7 do grupo ENG (35%). Dentre as 43 mulheres que não estão realizando o bloqueio hormonal, 8 estão em uso de DIU hormonal. Já o tratamento cirúrgico prévio nas mulheres portadoras de endometriose foi realizado em quase 15% das participantes e o procedimento mais realizado foi a ressecção de lesões peritoneais.

O exame físico foi realizado em todas as participantes do estudo. O exame físico abdominal foi efetuado, avaliando principalmente a existência de dor e distensão, seguido de exame ginecológico, no qual verificou-se especialmente a amplitude e sensibilidade da mobilização uterina, a existência de pontos de gatilho de dor e a presença de nódulos pélvicos. A dor à palpação abdominal existiu em 7 participantes (12, 07%) com distribuição semelhante entre os grupos, sendo 3 do grupo Controle, 2 do grupo EG e 2 do grupo ENG. A distensão abdominal foi identificada em apenas 2 participantes (3,45%), sendo ambas do grupo EG. Pontos de gatilho de dor foram identificados em 1 participante do grupo Controle, 14 do grupo EG e 12 do grupo ENG. Nódulos pélvicos foram identificados à palpação em 17 participantes, com distribuição semelhante pelos grupos. A análise estatística comparando os grupos não detectou diferenças significativas entre eles em nenhum dos itens mencionados acima.

Além da anamnese e exame físico, a investigação das participantes contou com a realização de exames de imagem para auxiliar no estabelecimento mais preciso do diagnóstico e definição do tratamento adequado (Figura 9). Um total de 33 participantes (56,9%) possuíam RM da pelve, 1 tinha tomografia computadorizada (TC) da pelve, 4 apresentaram US especializado para endometriose e 20 portavam USTV. De todos estes exames, praticamente a metade deles (48,21%) foi realizada pela equipe de radiologistas do HFR.

Figura 10. Gráfico de setor dos exames de imagem realizados no ELBE



O Gráfico representa a distribuição da frequência dos tipos de exames de imagens realizados pelas participantes do ELBE durante a investigação de sua patologia. RM: ressonância magnética; TC: tomografia computadorizada; US: ultrassonografia; e USTV: ultrassonografia transvaginal. Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste estudo, 7 participantes do grupo EG e 2 do grupo ENG apresentaram acometimento do compartimento anterior da pelve; 10 do grupo EG e 2 do grupo ENG têm comprometimento dos compartimentos laterais da pelve e 18 do grupo EG e 11 do grupo ENG carregam lesões endometrióticas no compartimento posterior da pelve.

Todas as participantes do ELBE foram submetidas a tratamento cirúrgico de sua patologia ginecológica. A individualização dos locais acometidos pelas lesões de endometriose foi realizada e, desta maneira, identificou-se que os locais acometidos foram: peritônio parietal, ligamento uterossacro, ovário, septo retovaginal, fossa ovárica, útero, trompa, reto, ligamento redondo, sigmóide, bexiga, apêndice, retossigmoide, ceco, parede abdominal, cicatriz de cesárea e paramétrio. A Tabela 7 abaixo indica o número de achados em cada estrutura anatômica.

Tabela 7. Localização das lesões endometrióticas

Localização da lesão endometriótica	Número de achados	%
Peritônio	35	87,5
Ligamento uterossacro	31	77,5
Ovário	22	55
Septo retovaginal	20	50
Fossa ovárica	19	47,5
Trompa	10	25
Reto	10	25
Útero	10	25
Ligamento redondo	6	15
Fórnice vaginal	3	7,5
Sigmóide	3	7,5
Apêndice	2	5
Bexiga	2	5
Retossigmóide	1	2,5
Ceco	1	2,5
Paramétrio	1	2,5
Parede abdominal	1	2,5
Cicatriz de cesárea	1	2,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de intercorrências per operatórias ocorreu em 3 cirurgias e os acontecimentos foram: 1 episódio de sangramento aumentado sem necessidade de

transusão de concentrado de hemácias, a realização de 1 conversão de cirurgia laparoscópica para laparotômica e 1 ocorrência de extravasamento de solução de azul de metileno pela sutura intestinal no momento de avaliação desta sutura. O pós-operatório hospitalar de todas as participantes do estudo ocorreu sem intercorrências graves ou necessidade de reabordagem e o acompanhamento ambulatorial foi realizado de forma individualizada, incluindo retornos programados com 15 e 45 dias de pós operatório.

6.2 Aspectos histopatológicos do endométrio

6.2.1 Endometrio eutópico

Para o estudo do endométrio eutópico, foram realizadas biópsias do tecido da cavidade uterina com auxílio de pinça sacabocado ou de histeroscopia. Este procedimento foi padronizado como o primeiro passo do tratamento cirúrgico e foi realizado após anestesia e adequada assepsia da participante.

Dentre todas as amostras endometriais, 48 estavam na fase proliferativa (81,36%) e 11 na fase secretora (18,64%). O epitélio colunar estava presente em apenas 25,42% (n = 15). Ao analisar o epitélio das amostras, não foi identificada a presença de mitoses epiteliais. A hemorragia epitelial, caracterizada como presença de sangue no lúmen da glândula, foi identificada em apenas 1 espécime e a presença de polimorfonucleares ou foco inflamatório epitelial não foi detectada em nenhuma amostra. A avaliação do estroma do endométrio eutópico identificou a presença de mitose em 1 exemplar, a ocorrência de hemorragia em 25 amostras, sendo elas 10 no grupo controle, 9 no EG e 6 no ENG, e a existência de foco inflamatório em 10% do material. A decidualização do estroma foi investigada e sua detecção ocorreu em apenas em participantes portadoras de endometriose, sendo 1 no grupo EG e 4 no grupo ENG, totalizando 5 amostras. A análise estatística de todos estes parâmetros comparando os grupos entre si não detectou diferença significativa.

A presença de células linfóides no endométrio eutópico ocorreu de forma focal 45% (n = 27) das amostras, sendo 10 no grupo Controle, 10 no grupo EG e 7 no grupo ENG. A ocorrência de células linfóides de maneira multifocal ou difusa não foi identificada. A Figura 11 ilustra estes achados assim como evidencia a proporção de amostras com a presença das células linfóides em cada grupo.

Figura 11. Células linfóides no endométrio eutópico

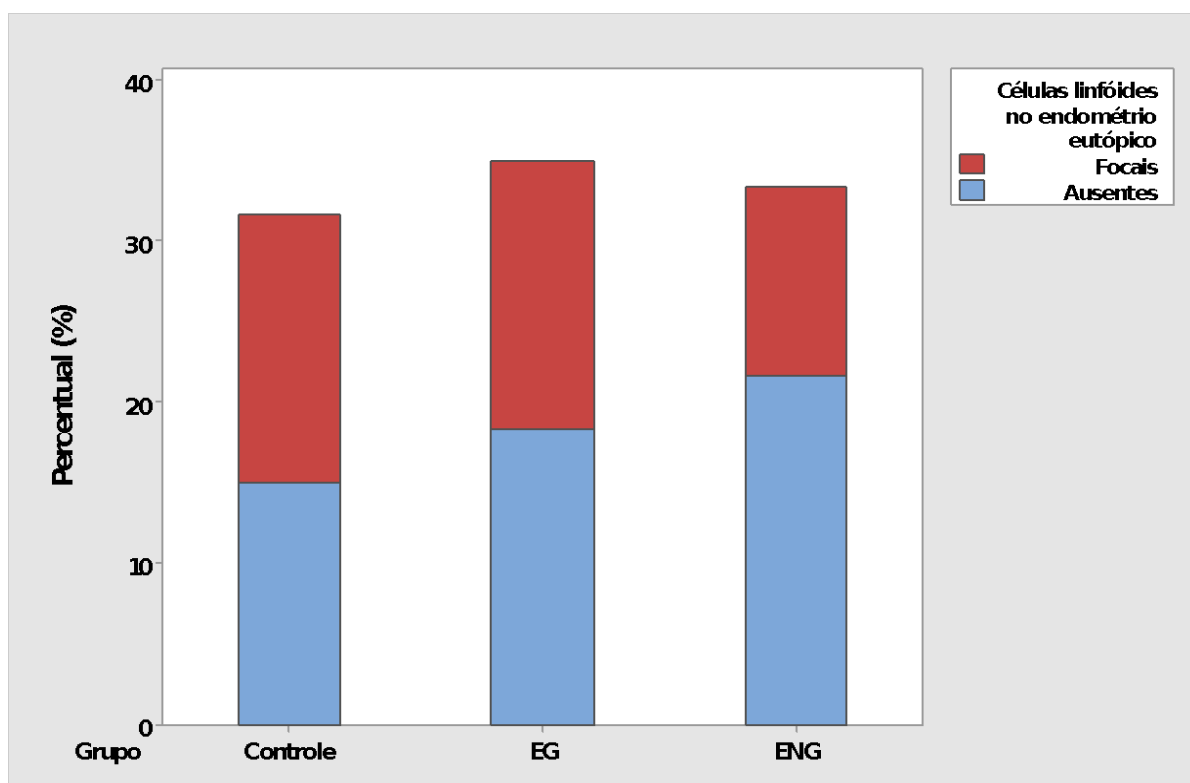
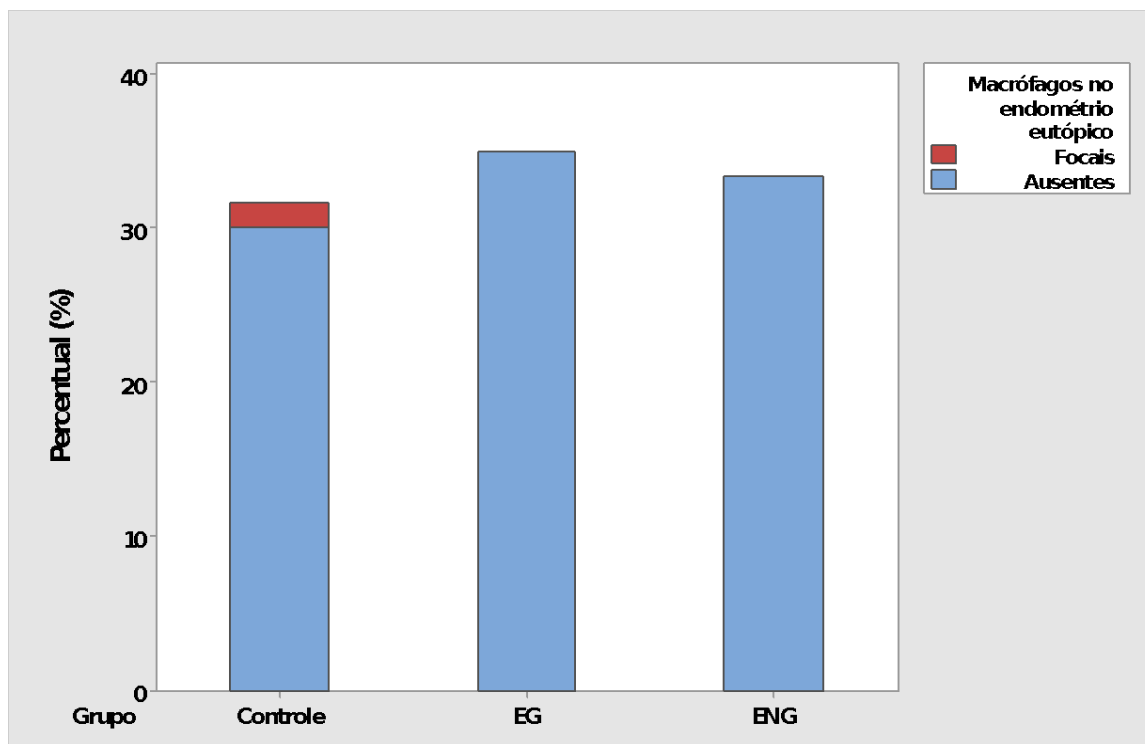


Gráfico de barras mostrando a proporção entre amostras com células linfóides e sem a presença destas células em cada grupo do estudo. No grupo controle, 52,63% das amostras possuíam células linfóides focais; no grupo EG este valor foi de 47,62% e no ENG de 35%. Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre todas as amostras analisadas, em apenas uma houve a identificação de macrófagos e este exemplar pertencia ao grupo Controle. A representação gráfica deste achado encontra-se na Figura 12.

Figura 12. Macrófagos no endométrio eutópico



A identificação de macrófagos ocorreu em apenas uma das amostras analisadas, representando 5,26% do grupo Controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em conjunto, esses foram os principais resultados obtidos a partir da análise histopatológica convencional do endométrio eutópico.

6.2.2 Endométrio ectópico

Para o estudo do endométrio ectópico, foram selecionados fragmentos de lesões endometrióticas ressecadas no tratamento cirúrgico das participantes.

Todas as amostras de endométrio ectópico encontravam-se na fase proliferativa endometrial. Nessas amostras não foram identificados: (i) epitélio colunar; (ii) mitose epitelial; (iii) hemorragia epitelial; (iv) foco inflamatório epitelial; e (v) mitose no estroma.

A presença de sangue no lúmen da glândula do estroma, definindo a presença de hemorragia no estroma, está presente em 10 amostras (26,32%), sendo 2 amostras do grupo EG e 8 do grupo ENG, o que representa 10,53% e 42,11% de cada grupo, respectivamente, com diferença estatística significativa ($P\text{-Value} = 0,027$). O foco inflamatório no estroma foi identificado em 2 exemplares, sendo 1 do grupo EG

e 1 do grupo ENG, e a decidualização do estroma identificado em apenas 1 amostra, sendo esta pertencente ao grupo EG.

A presença de células linfóides no endométrio ectópico foi identificada em 22 amostras, sendo em 21 delas de forma focal e em 1 de forma difusa. A Figura 11 demonstra esses achados.

Figura 13. Células linfóides no endométrio ectópico

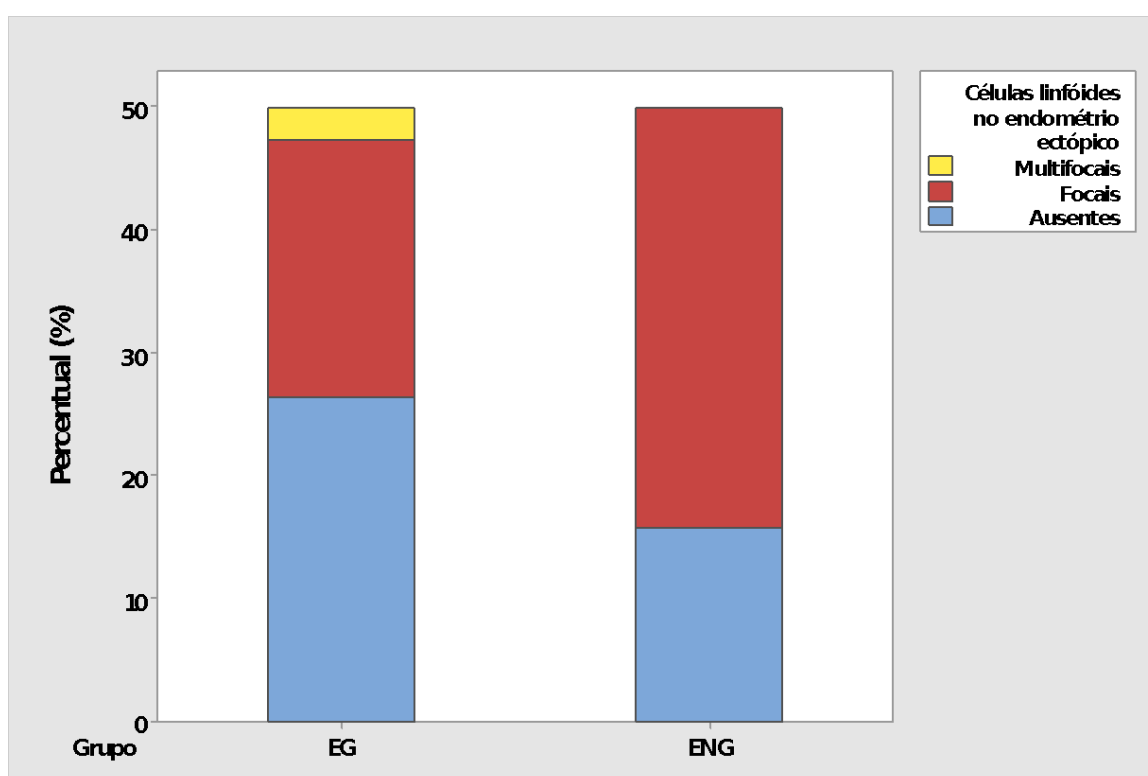


Gráfico de barras mostrando a proporção entre amostras com células linfóides e sem a presença destas células em cada grupo do estudo. No grupo EG 52,63% das amostras não possuíam células linfóides (n=10), 42,11% apresentaram distribuição focal destas células (n=8) e 5,26% apresentaram distribuição difusa das células linfóides. Já no grupo ENG 31,58% (n = 6) das amostras não possuíam células linfóides e 68,42% (n=13) apresentaram distribuição focal destas células. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os macrófagos foram identificados em 14 amostras de endométrio ectópico deste estudo. De forma focal, eles estavam presentes em 11 amostras e, de forma difusa, em 3 amostras. A Figura 14 ilustra estes achados assim como evidencia a proporção de amostras com a distribuição dos macrófagos em cada grupo.

Figura 14. Macrófagos no endométrio ectópico

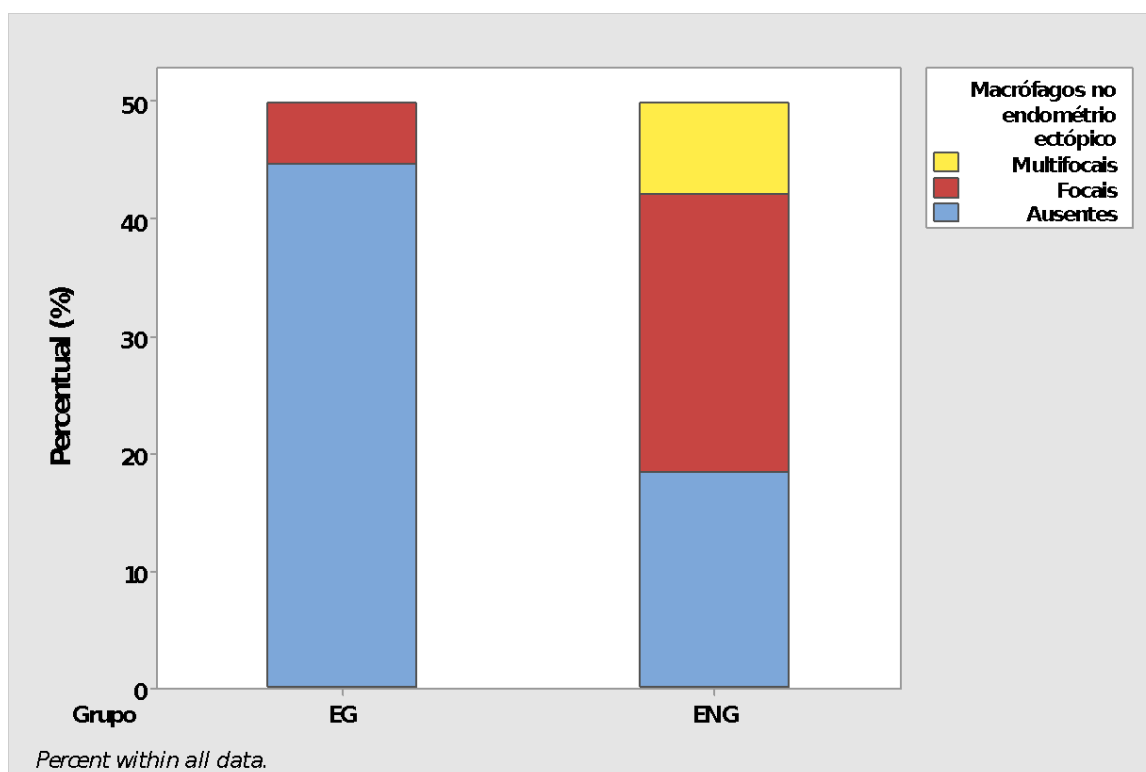


Gráfico de barras mostrando a distribuição dos macrófagos e a proporção entre amostras em cada grupo. No grupo EG, em 89,47% das amostras ($n = 17$) não houve a identificação de macrófagos e em 10,53% ($n = 2$) a distribuição destes era focal. No grupo ENG, em 36,84 % das amostras ($n = 7$) não houve a identificação de macrófagos, em 47,37% ($n = 9$) a distribuição destes era focal e em 15,79% ($n = 3$) a distribuição era multifocal. Fonte: Elaborado pelo autor.

Complementando a análise histopatológica, foram comparados os resultados do endométrio eutópico versus endométrio ectópico nos grupos ENG e EG. Em seguida, foram comparados os resultados das análises do endométrio eutópico e ectópico entre os grupos ENG e EG.

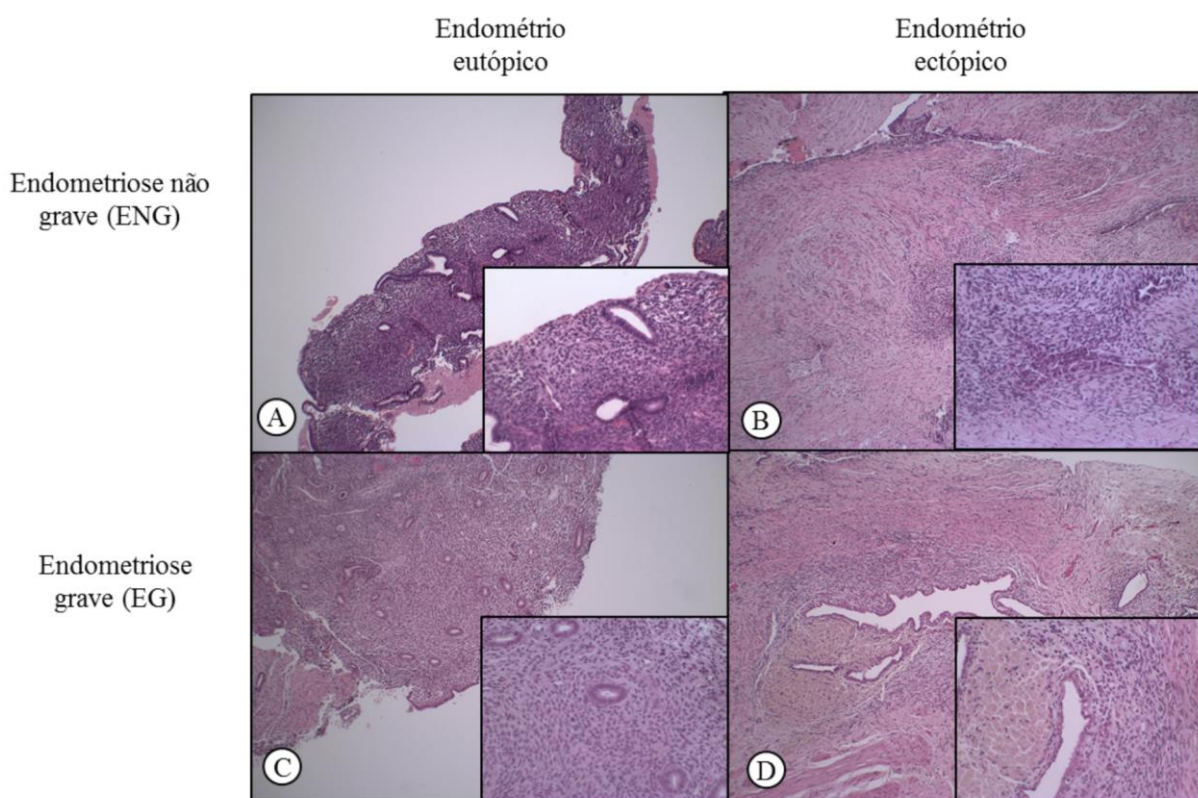
Na comparação dos resultados do endométrio eutópico versus endométrio ectópico nos grupos ENG e EG, as presenças de células linfóides e macrófagos foram significativamente superiores (P -Values = 0,027 e 0,000, respectivamente) no endométrio ectópico do grupo ENG, em relação ao endométrio eutópico. No grupo EG, não foram observadas diferenças nas quantidades de células linfóides e de macrófagos entre essas duas sedes de endométrio.

Considerando-se agora a comparação do endométrio eutópico e ectópico entre os grupos ENG e EG, a única característica histopatológica com significância estatística (P -Value = 0,000) foi a quantidade de macrófagos no endométrio ectópico do grupo EG. Foram observados focos mais frequentes de macrófagos no endométrio

ectópico do grupo EG, quando comparados com os focos das amostras do grupo ENG.

Para ilustrar os resultados da análise histopatológica, a Figura 15 apresenta fotomicrografias representativas dos endométrios eutópico e ectópico dos grupos EG e ENG, além de aspectos do endométrio normal do grupo Controle.

Figura 15. Aspectos morfológicos dos endométrios eutópico e ectópico



Endométrios eutópicos e ectópicos de participantes dos Grupos Endometriose não grave (ENG) e grave (EG). A e C – Fragmentos de endométrio na fase proliferativa apresentando focos com células linfóides periglandulares (HE x 40). B e D – Glândulas e estroma com padrão endometrial em meio a tecido conjuntivo apresentando macrófagos esparsos e agrupados (hemossiderófagos), respectivamente (HE x 40). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Aspectos imunológicos no sangue periférico

Com o objetivo de mostrar o comportamento estatístico dos dados de biomarcadores imunológicos dos grupos Controle, EG e ENG, primeiramente apresentaremos os valores de média, desvio-padrão da média e mediana, que representam as principais medidas de tendência central dos valores das concentrações dos biomarcadores avaliados no estudo. Em seguida, serão

apresentados os resultados de comparação entre os grupos para cada segmento de biomarcadores avaliados (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento).

A Tabela 8 abaixo apresenta os dados da estatística média, desvio-padrão da média e mediana, que representam as principais medidas de tendência central dos valores das concentrações das quimiocinas.

Tabela 8. Quimiocinas no sangue periférico.

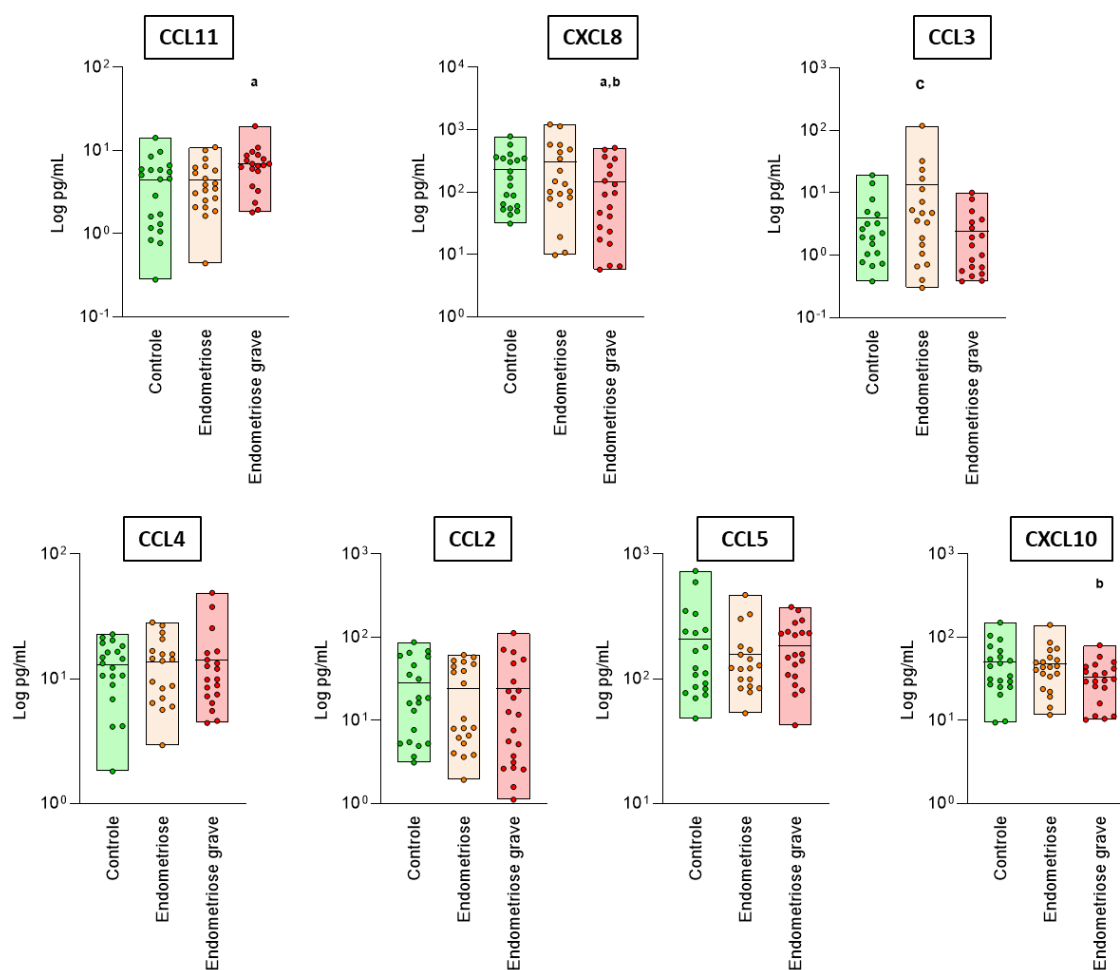
Quimiocina	Grupo	Unidade de medida		
		Média	Desvio-padrão	Mediana
CCL11/ EOTAXIN	Controle	4,406	0,806	4,570
	EG	6,345	0,929	6,560
	ENG	4,429	0,628	3,675
CXCL8	Controle	225,2	45,9	148,0
	EG	178,8	48,7	92,0
	ENG	307,0	82,4	134,8
MIP-1 α / CCL3	Controle	4,01	1,19	2,11
	EG	2,43	0,65	1,22
	ENG	13,25	6,56	4,16
MIP-1 β / CCL4	Controle	17,37	4,54	13,89
	EG	14,21	2,66	9,92
	ENG	36,4	17,0	14,4
MCP-1/ CCL2	Controle	28,50	5,89	17,43
	EG	24,08	6,52	11,71
	ENG	24,26	4,89	9,31
RANTES/ CCL5	Controle	197,9	41,6	116,4
	EG	176,5	21,8	155,6
	ENG	143,4	24,6	120,6
IP-10/ CXCL10	Controle	49,77	7,87	39,48
	EG	34,65	4,10	31,51
	ENG	47,60	6,59	43,88

Estatísticas da concentração em pg/mL de quimiocinas em amostras de sangue periférico. Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações de quimiocinas apresentaram elevada variabilidade entre os grupos. O grupo Controle apresentou as maiores medianas para CXCL8 e CCL2. O grupo EG apresentou as maiores medianas para CCL11 e CCL5. E o grupo ENG apresentou as maiores medianas para CCL3, CCL4 e CXCL10.

Essas observações gerais sobre os resultados das concentrações médias das quimiocinas foram confirmadas pela aplicação de testes estatísticos, que compararam os grupos entre si. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas seguintes comparações: (i) CCL11, entre EG e Controle, (ii) CXCL10, entre EG e ENG; (iii) CXCL8, entre EG e ENG; (iv) CXCL8, entre EG e Controle; (v) CCL3, entre ENG e Controle. A Figura 16 ilustra esses achados supracitados.

Figura 16. Perfil de quimiocinas no sangue periférico



Diagramas de caixa (*boxplot*) do perfil de quimiocinas circulantes nas participantes do ELBE. O eixo X corresponde aos grupos do estudo enquanto o eixo Y relaciona-se com a concentração, em Log pg/mL, dos biomarcadores indicados nos retângulos. Ao comparar a concentração média de CCL11 do grupo Endometriose grave (EG) com o grupo Controle, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (a). Ao comparar a concentração média de CXCL8 do grupo EG com os grupos ENG e Controle,

encontraram-se diferenças estatisticamente significativas (a,b), nesta ordem. Ao comparar a concentração média de CCL3 do grupo ENG com o grupo Controle, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (c). Ao comparar a concentração média de CXCL10 do grupo EG com o grupo ENG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (b). As diferenças estatisticamente significativas estão representadas por letras: “a” em relação ao grupo Controle, “b” em relação ao grupo ENG e “c” em relação ao grupo EG. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 9 apresenta as estatísticas média, desvio-padrão da média e mediana das concentrações das citocinas pró-inflamatórias de acordo com os grupos do estudo.

Tabela 9. Citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico

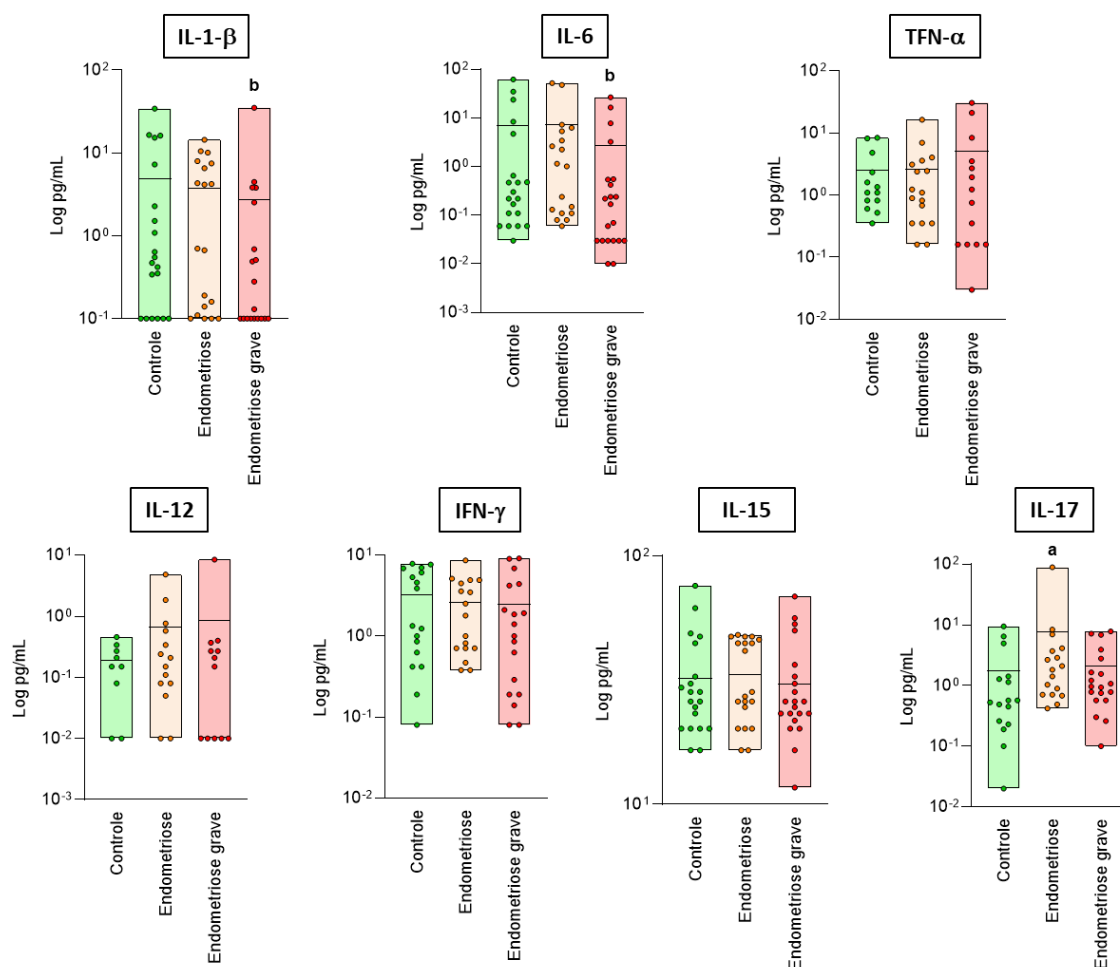
Citocina pró-inflamatória	Grupo	Estatísticas		
		Média	Desvio-padrão	Mediana
IL-1 β	Controle	4,87	2,01	0,51
	EG	2,75	1,83	0,13
	ENG	3,598	0,998	0,685
IL-6	Controle	6,85	3,54	0,26
	EG	2,70	1,46	0,17
	ENG	6,54	3,38	0,63
TNF	Controle	2,457	0,784	1,1
	EG	4,82	2,65	0,75
	ENG	2,641	0,961	1,1
IL-12	Controle	0,1867	0,0503	0,15
	EG	0,850	0,695	0,18
	ENG	0,664	0,345	0,18
IFN- γ	Controle	3,270	0,728	1,340
	EG	2,473	0,716	1,205
	ENG	2,629	0,577	1,800
IL-15	Controle	32,05	3,54	27,14
	EG	30,56	3,17	25,92
	ENG	33,13	2,72	27,77
IL-17	Controle	1,756	0,685	0,550
	EG	2,105	0,568	0,960
	ENG	7,51	5,11	1,820

Estatísticas da concentração de citocinas pró-inflamatórias em amostras de sangue periférico. Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações de citocinas pró-inflamatórias apresentaram elevada variabilidade entre os grupos. O grupo Controle apresentou a maior mediana para TNF-alfa. O grupo EG apresentou a maior mediana para IL-12. E o grupo ENG apresentou as maiores medianas para IL-1 β , IL-6, TNF-alfa, IL-12, IFN- γ , IL-15 e IL-17.

Essas observações gerais sobre os resultados das concentrações médias das citocinas pró-inflamatórias foram confirmadas pela aplicação de testes estatísticos, que compararam os grupos entre si. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas seguintes comparações: (i) IL-1 β , entre EG e ENG; (ii) IL-6, entre EG e ENG; (iii) IL-17, entre ENG e Controle. A Figura 17 demonstra esses achados supracitados.

Figura 17. Perfil de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico



Diagramas de caixa (*boxplot*) do perfil de citocinas inflamatórias circulantes nas participantes do ELBE. O eixo X corresponde aos grupos do estudo enquanto o eixo Y relaciona-se com a concentração, em Log pg/mL, dos biomarcadores indicados nos retângulos. Ao comparar as concentrações medianas de IL1 β e IL-6 do grupo Endometriose grave (EG) com o grupo Endometriose não Grave (ENG), encontram-se diferenças estatisticamente significativas (b). Ao comparar a concentração média de IL-17 do grupo Controle com grupo ENG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (a). Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 10 abaixo apresenta os dados da estatística média, desvio-padrão da média e mediana, que representam as principais medidas de tendência central dos valores das concentrações das citocinas reguladoras.

Tabela 10. Citocinas reguladoras no sangue periférico

Citocina reguladora	Grupos	Estatísticas		
		Média	Desvio-padrão	Mediana
IL-1ra	Controle	230,5	24,9	227,4
	EG	304,2	95,9	139,3
	ENG	185,5	25,4	177,3
IL-4	Controle	0,3445	0,0583	0,2600
	EG	0,4043	0,0373	0,4000
	ENG	0,4010	0,0316	0,4250
IL-5	Controle	4,834	0,963	3,135
	EG	4,157	0,914	2,355
	ENG	4,306	0,715	2,590
IL-9	Controle	4,605	0,475	4,580
	EG	3,971	0,348	3,760
	ENG	6,272	0,815	5,390
IL-10	Controle	0,745	0,14	0,515
	EG	2,06	1,31	0,480
	ENG	1,565	0,796	0,600
IL-13	Controle	0,295	0,12	0,16
	EG	0,2315	0,0621	0,11
	ENG	0,3394	0,0825	0,21

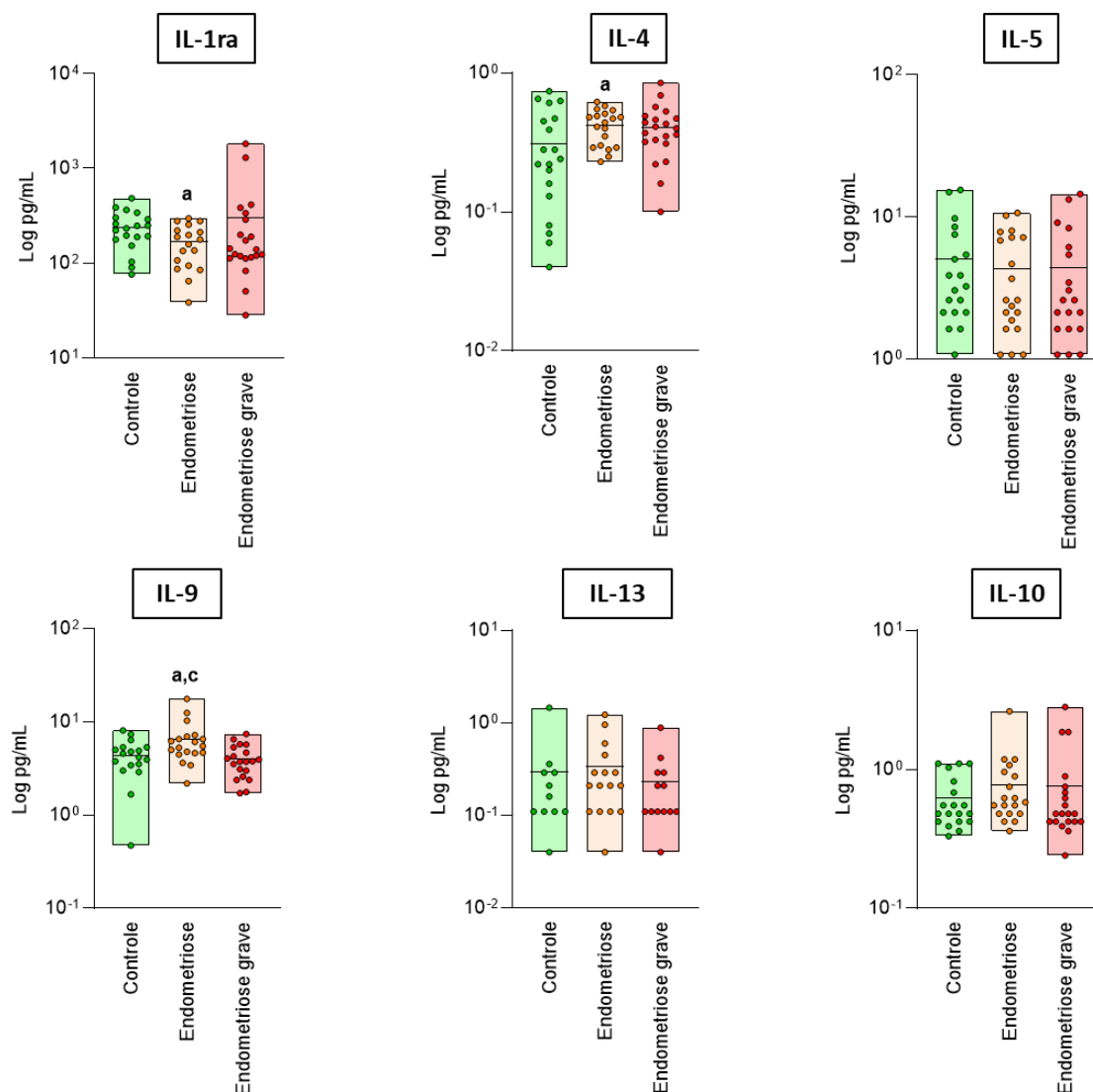
Estatísticas da concentração em pg/mL de citocinas reguladoras em amostras de sangue periférico. Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações de citocinas reguladoras também apresentaram elevada variabilidade entre os grupos. O grupo Controle apresentou a maior mediana para IL-1ra e IL-5 e o grupo ENG apresentou a maior mediana para as demais citocinas.

Essas observações gerais sobre os resultados das concentrações médias das citocinas reguladoras foram confirmadas pela aplicação de testes estatísticos, que compararam os grupos entre si. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas seguintes comparações: (i) IL-1ra, entre ENG e Controle; (ii) IL-4,

entre ENG e Controle; (iii) IL-9, entre ENG e EG; (iv) IL-9, entre ENG e Controle. A Figura 18 expõe esses achados supracitados.

Figura 18. Perfil de citocinas reguladoras no sangue periférico



Diagramas de caixa (*boxplot*) do perfil de citocinas reguladoras circulantes nas participantes do ELBE. o eixo X corresponde aos grupos do estudo, enquanto o eixo Y relaciona-se com a concentração, em Log pg/mL, dos biomarcadores indicados nos retângulos. Ao comparar as concentrações medianas de IL1ra, IL-4 E IL-9 do grupo Endometriose não grave (ENG) com o grupo Controle, encontram-se diferenças estatisticamente significativas (a). Ao comparar a concentração média de IL-9 do grupo ENG com grupo Endometriose Grave (EG), encontrou-se diferença estatisticamente significativa (c). Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 11 abaixo apresenta os dados da estatística média, desvio-padrão da média e mediana, que representam as principais medidas de tendência central dos valores das concentrações dos fatores de crescimento.

Tabela 11. Fatores de crescimento no sangue periférico

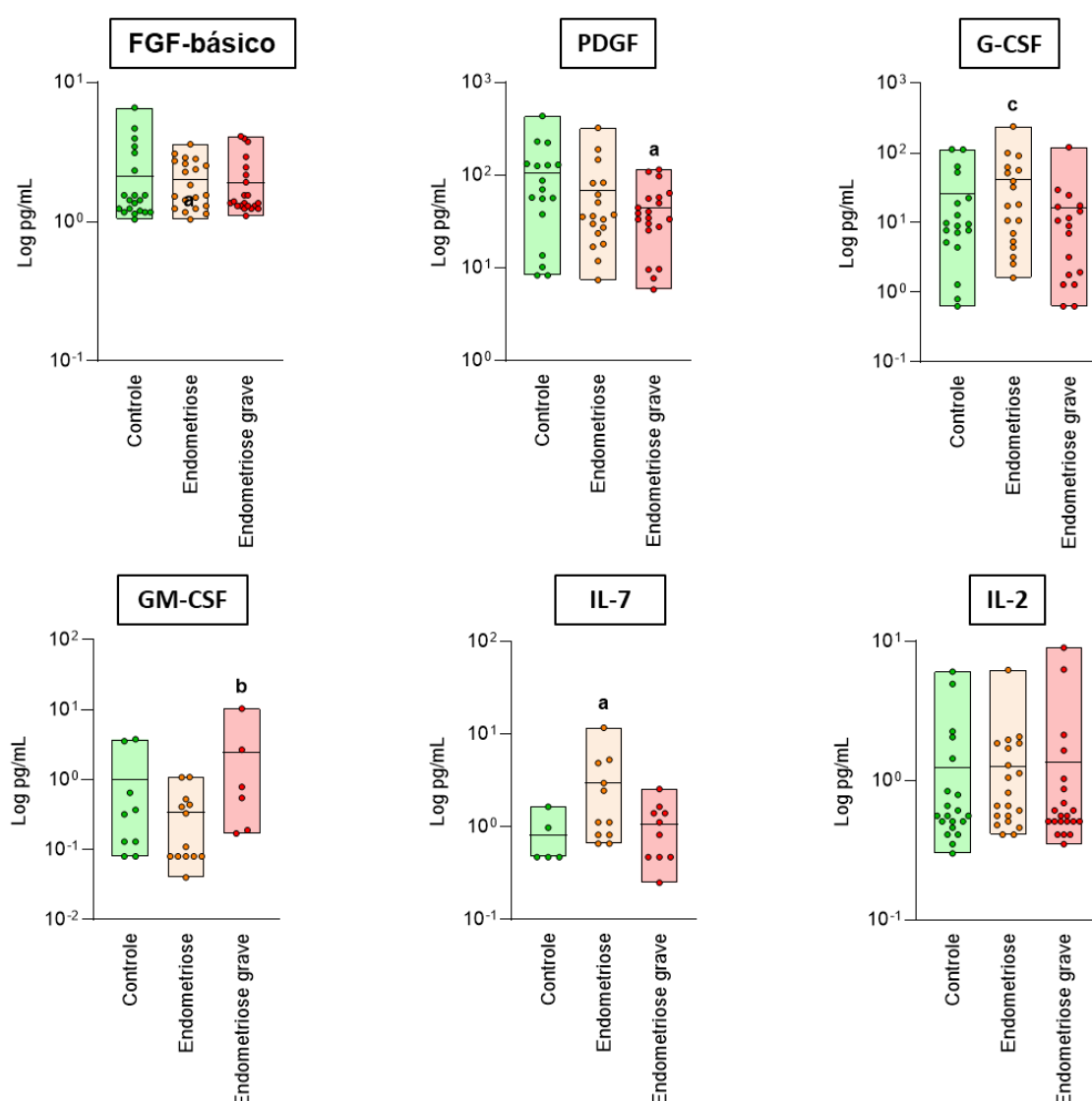
Quimiocina	Grupo	Estatísticas		
		Média	Desvio-padrão	Mediana
FGF basic	Controle	2,119	0,334	1,430
	EG	1,900	0,211	1,360
	ENG	1,993	0,175	1,695
PDGF-bb	Controle	91,2	23,9	57,0
	EG	48,24	7,75	38,64
	ENG	60,8	17,5	34,4
G-CSF	Controle	25,48	8,45	9,26
	EG	110,7	89,7	10,7
	ENG	37,8	12,6	14,1
GM-CSF	Controle	1,011	0,506	0,320
	EG	1,87	1,25	0,370
	ENG	0,607	0,283	0,220
IL-7	Controle	0,808	0,233	0,470
	EG	1,061	0,226	0,970
	ENG	2,572	0,886	1,120
IL-2	Controle	1,241	0,350	0,560
	EG	1,366	0,476	0,560
	ENG	1,265	0,292	0,740

Estatísticas da concentração em pg/mL de quimiocinas em amostras de sangue periférico. Fonte: Elaborado pelo autor.

As concentrações dos fatores de crescimento apresentaram elevada variabilidade entre os grupos. O grupo Controle apresentou a maior mediana para PDGFbb. O grupo EG apresentou a maior mediana para GM-CSF. E o grupo ENG apresentou as maiores medianas para FGF, G-CSF, IL-7 e IL-2.

Essas observações gerais sobre os resultados das concentrações médias das citocinas reguladoras foram confirmadas pela aplicação de testes estatísticos, que compararam os grupos entre si. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas seguintes comparações: (i) PDGF, entre os grupos EG e Controle; (ii) IL-7, entre os grupos ENG e Controle; (iii) GM-CSF, entre EG e ENG; (iv) G-CSF, entre ENG e EG. A Figura 19 expõe esses achados supracitados.

Figura 19. Perfil de fatores de crescimento no sangue periférico



Diagramas de caixa (*boxplot*) do perfil de fatores de crescimento circulantes nas participantes do ELBE. O eixo X corresponde aos grupos do estudo enquanto o eixo Y relaciona-se com a concentração, em Log pg/mL, dos biomarcadores indicados nos retângulos. Ao comparar as concentrações medianas de PDGF do grupo Endometriose grave (EG) com o grupo Controle, encontram-se diferenças estatisticamente significativas (a). Ao comparar as concentrações medianas de IL-7 do grupo Endometriose não grave (ENG) com o grupo Controle, encontram-se diferenças estatisticamente

significativas (a). Ao comparar a concentração média de GM-CSF do grupo EG com grupo ENG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (b). Ao comparar a concentração média de G-CSF do grupo ENG com grupo EG, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (c). Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 Análises estatísticas multivariadas dos biomarcadores imunológicos

Com o objetivo de realizar análises multivariadas para a seleção de variáveis candidatas ao uso clínico em endometriose, foram indicados, a partir das análises comparativas prévias e das presentes análises de regressão logística e discriminante, as características idade e peso, a presença de dor pélvica crônica, a ocorrência de células linfóides e macrófagos no exame histopatológico e os biomarcadores imunológicos CCL11, CXCL8, IL-9, CCL3 e IL-7.

A Tabela 12 apresenta os resultados da análise de regressão logística binária das principais variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre os grupos EG e ENG ou que podem ser considerados mediadores promissores.

Tabela 12. Regressão logística binária de variáveis clínicas e laboratoriais distintivas dos grupos EG e ENG

Variável	b	Significância	OR	IC 95%
Idade	-0,118	0,654	1,32	0,38 ; 4,62
IMC	-0,486	0,111	2,78	0,77 ; 10,04
Dor pélvica crônica	-0,511	0,158	2,50	0,68 ; 9,08
Células linfóides no endométrio eutópico	-0,167	0,411	1,68	0,48 ; 5,92
Células linfóides no endométrio ectópico	-0,879	0,187	0,41	0,11 ; 1,55
Macrófagos no endométrio ectópico	-2,679	0,000	0,06	0,01 ; 0,38

CCL11	-0,832	0,081	1,18	0,96 ; 1,45
CXCL8	0,474	0,161	0,99	0,99 ; 1,00
IL-9	-0,462	0,005	0,63	0,41 ; 0,94
CCL3	-0,1586	0,012	0,85	0,70 ; 1,03
IL-7	0,520	0,081	0,59	0,26 ; 1,33
Macrófagos no endométrio ectópico + IL-9	-0,328	0,001	0,08	0,01 ; 0,53

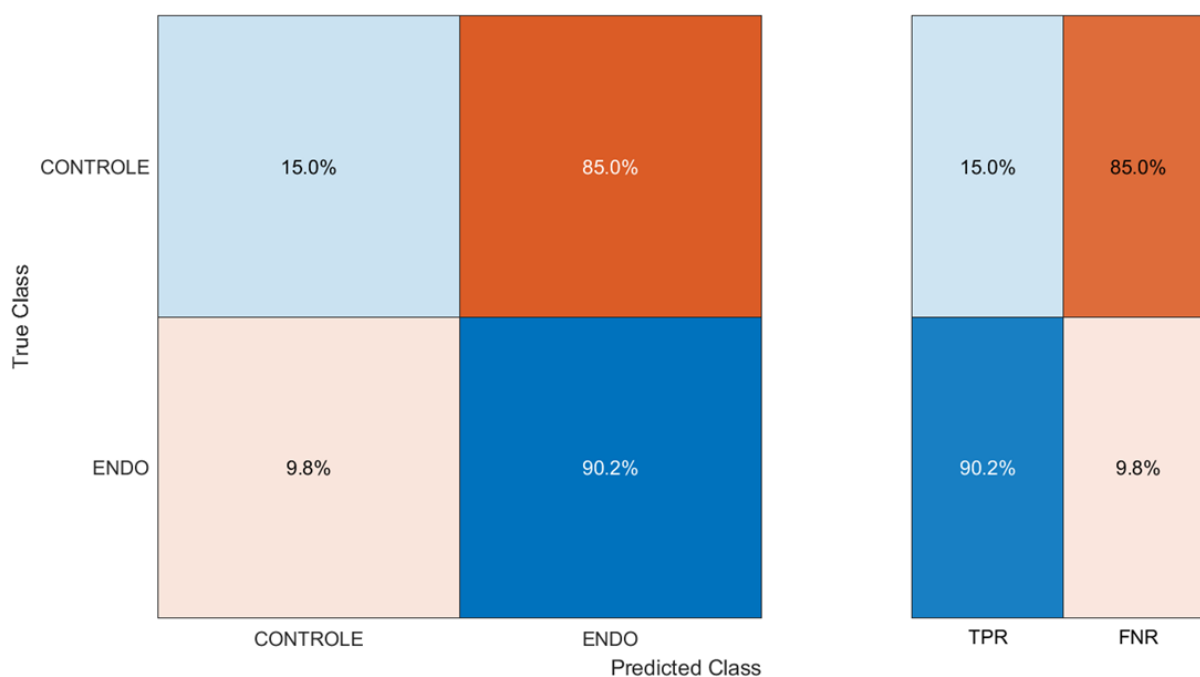
OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança. Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses resultados da análise de regressão logística univariada demonstraram as influências das variáveis: macrófagos no endométrio ectópico; CCL11; IL-9; CCL3; e IL-7 na redução do risco de endometriose grave a partir do diagnóstico de endometriose não grave. Adicionalmente, após combinação de todas as variáveis duas a duas, foi observado modelo bivariado com macrófagos no endométrio ectópico e IL-9 determinante da redução do risco de endometriose grave.

Por último e finalizando a apresentação dos resultados do estudo, foram constituídos dois modelos multivariados com os biomarcadores imunológicos para discriminação dos seguintes grupos: Controle versus Endometriose (EG + ENG); e EG versus ENG. Esses modelos foram ajustados de acordo com os resultados das análises comparativas e de regressão logística prévios.

A Figura 20 apresenta o resultado gráfico do modelo preditivo ajustado dos biomarcadores CCL11, IL-7 e IL-9 para discriminação dos grupos Controle versus Endometriose.

Figura 20. Modelo multivariado preditivo de classificação dos grupos Controle e Endometriose (ENDO)

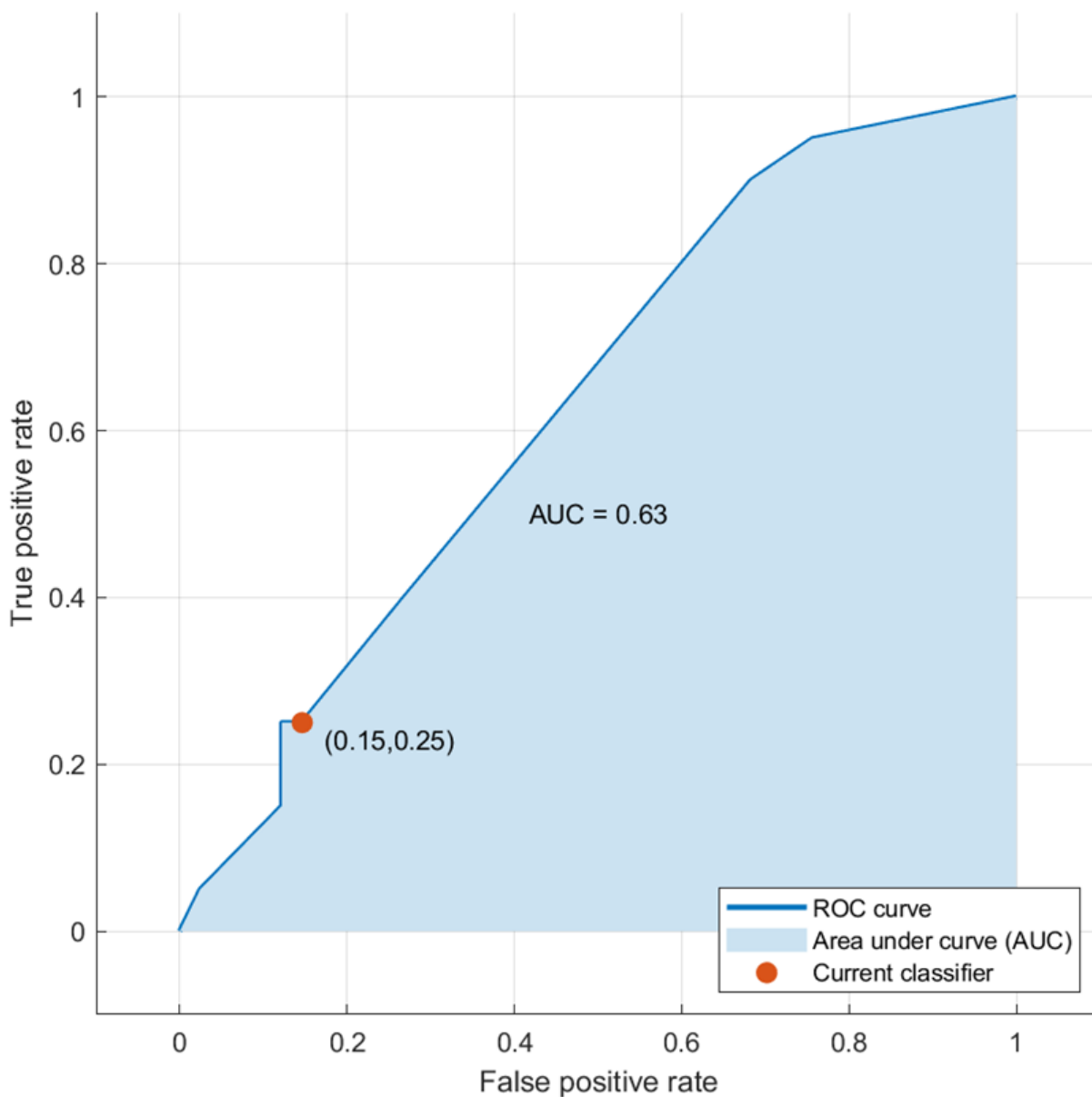


Quadros de classes verdadeiras (*True Class*) e preditas (*Predicted Class*) e de proporções de verdadeiro positivo (TPR) e falso negativo (FNR) do modelo ajustado de classificação geral indicando ótimo resultado para classificação do grupo Endometriose (ENDO) e regular para o grupo Controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos Controle e Endometriose apresentou acurácia de 65,6%. A classificação do grupo Endometriose, com acerto ou proporção de casos verdadeiramente positivos de 90,2%, foi considerada ótima pelos critérios estatísticos de homogeneidade. Entretanto, o grupo Controle apresentou proporções elevadas de amostras falso negativas (85%).

Esse modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos Controle versus Endometriose também foi avaliado pela Curva ROC. A Figura 21 apresenta essa referida curva.

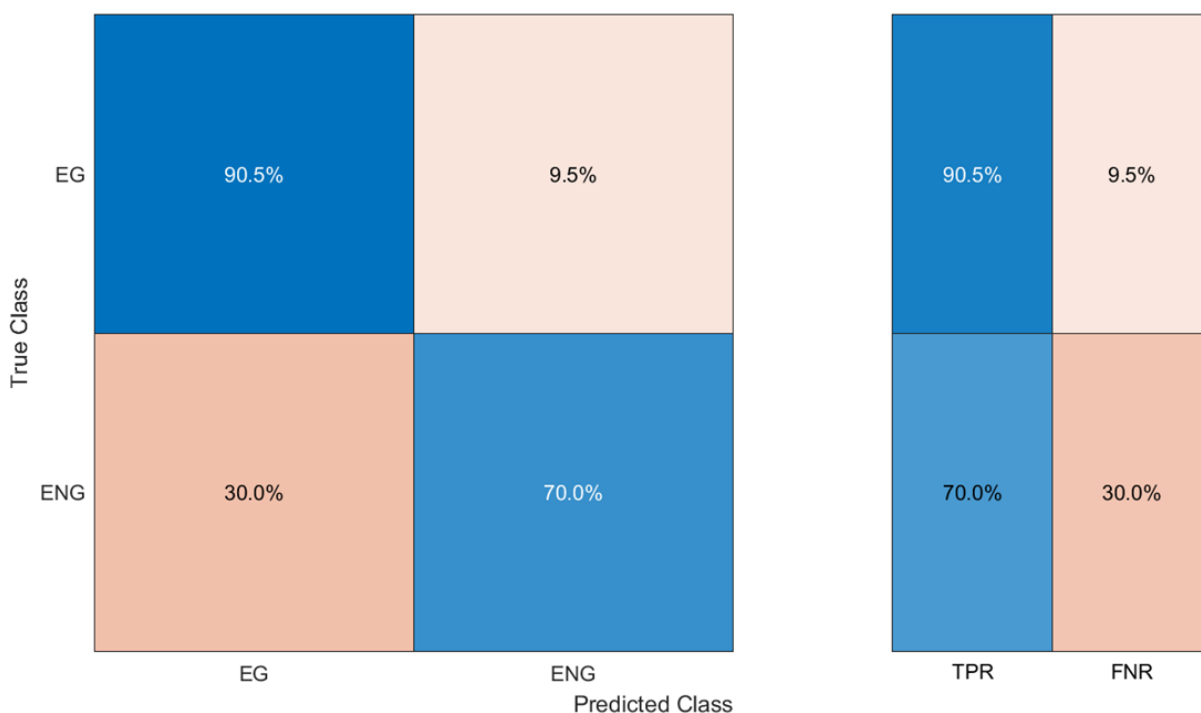
Figura 21. Curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos Controle versus Endometriose



A curva ROC do modelo de classificação geral apresentou área sob a curva de 63% e uma sensibilidade de 85% e especificidade de 75% no melhor ponto de classificação. Fonte: Elaborado pelo autor.

Complementarmente, a Figura 22 apresenta o resultado gráfico do modelo preditivo ajustado de classificação dos grupos EG versus ENG.

Figura 22. Modelo multivariado preditivo de classificação dos grupos Endometriose grave (EG) versus Endometriose não grave (ENG)

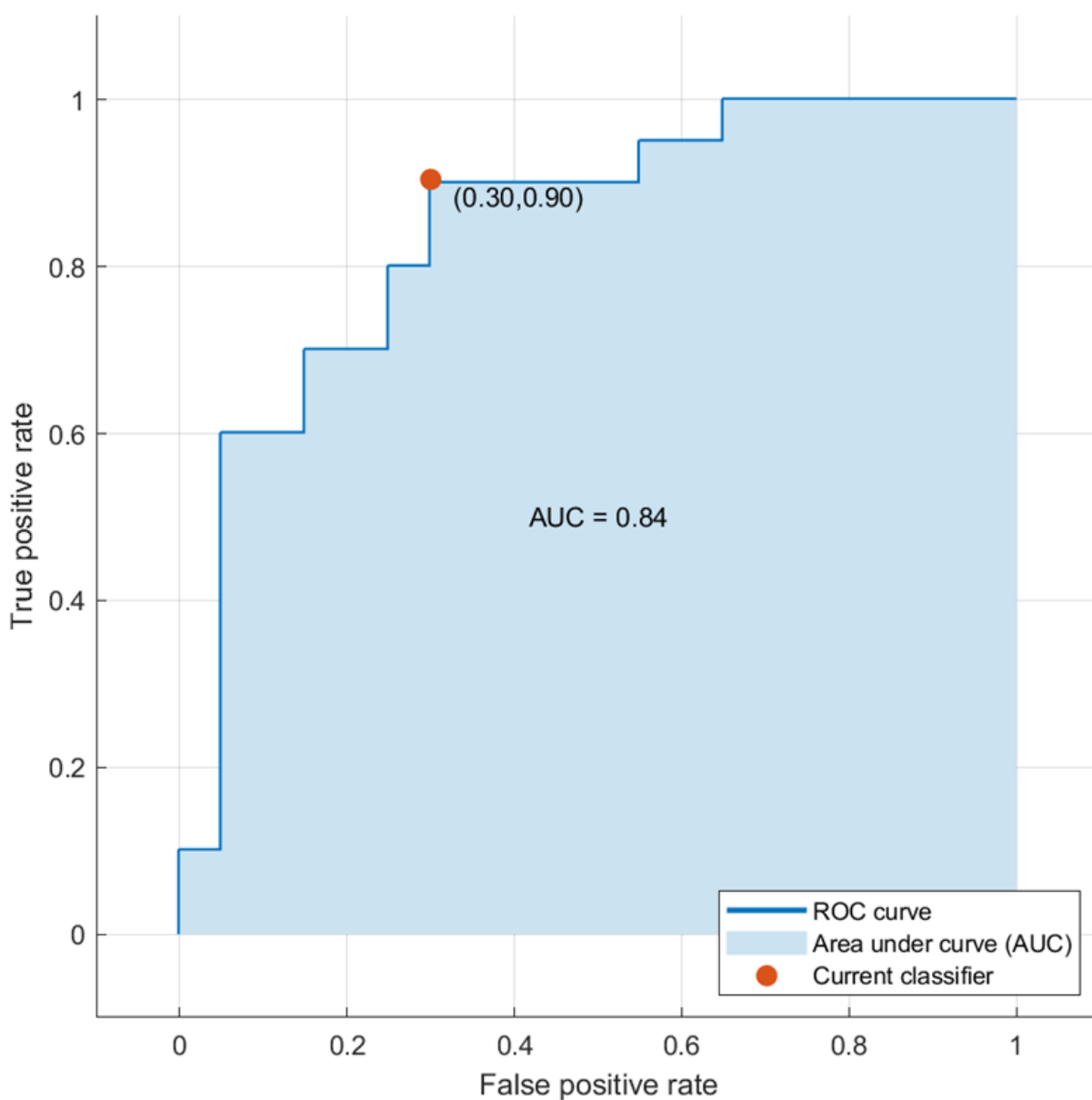


Quadros de classes verdadeiras (*True Class*) e preditas (*Predicted Class*) e de proporções de verdadeiro positivo (TPR) e falso negativo (FNR) do modelo ajustado de classificação geral indicando ótimo resultado para classificação do grupo Endometriose grave (EG) e bom resultado para o grupo Endometriose não grave (ENG). Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos EG versus ENG apresentou acurácia de 80,5%. A classificação do grupo EG, com acerto ou proporção de casos verdadeiramente positivos de 90,5%, foi considerada ótima pelos critérios estatísticos de homogeneidade. O grupo ENG apresentou proporções intermediárias de amostras falso negativas (30%) e a classificação foi considerada boa pelos mesmos critérios.

Esse modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos EG versus ENG também foi avaliado pela Curva ROC. A Figura 23 apresenta essa referida curva.

Figura 23. Curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos EG versus ENG



A curva ROC do modelo de classificação geral apresentou área sob a curva de 84% e uma sensibilidade de 70% e especificidade de 90% no melhor ponto de classificação. Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação geral dos grupos EG versus ENG apresentou área sob a curva de 84%, sensibilidade de 70% e especificidade de 90% no melhor ponto de classificação, finalizando esse tópico dos resultados.

7. DISCUSSÃO

Os resultados do projeto piloto do ELBE- Estudo Longitudinal de Biomarcadores em Endometriose, motivo desta dissertação, fortaleceram a hipótese do uso clínico de biomarcadores imunológicos para o diagnóstico e monitoramento ou prognóstico da endometriose. Em especial e além das características clínicas, este trabalho selecionou um conjunto de citocinas e quimiocinas presentes no sangue periférico, como CCL11, CXCL8, IL-9, CCL3 e IL-7, cujas concentrações demonstraram influência na história natural da doença, particularizaram a presença da endometriose em relação à sua ausência, com acurácia de 65,6%, e discriminaram o estágio mais grave da doença em relação à endometriose não grave, com acurácia de 80,5%.

Os desafios para a realização do projeto foram relevantes, destacando-se fundamentalmente a pandemia da COVID-19, que impactou muito significativamente nas agendas de atendimento clínico e cirúrgico. Em consequência direta deste contexto pandêmico, o número de participantes abordadas, selecionadas e incluídas no estudo (n = 61) foi aproximadamente a metade do número previsto para o mesmo período de tempo de atendimento em condições pré-pandêmicas. O contexto pandêmico também afetou toda a rotina de procedimentos laboratoriais, sendo necessário o congelamento de amostras para processamentos posteriores. Considerando a grande labilidade de muitas moléculas presentes no sangue periférico, essa condição imposta pode ter influenciado a concentração de algum biomarcador. Outras limitações pequenas e inerentes ao início de projetos de pesquisas, como mudança na codificação das participantes, inclusão de variáveis sem representatividade clínica e duplicidade de informações, também ocorreram. Entretanto, foram detectadas e prontamente corrigidas ou eliminadas na etapa das análises estatísticas e não impactaram os aspectos e resultados positivos do projeto, tanto institucionais, quanto técnicos e científicos.

No contexto dos sistemas de saúde, a realização do projeto piloto do ELBE também consolidou uma importante parceria interinstitucional entre o NIPTE - Núcleo Integrado de Pesquisa e Tratamento da Endometriose do Hospital Felício Rocho e o

GIPB - Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Instituto René Rachou, unidade da FIOCRUZ em Minas Gerais, para o desenvolvimento de pesquisas clínicas em endometriose, essa doença de elevada prevalência que acomete cerca de 10% da população feminina no menacme, tendo o seu pico de incidência entre os 25 e 34 anos (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021) e idade média de 36 anos (CARDOSO *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2012).

Em relação aos aspectos clínicos, nossos achados estão de acordo com a epidemiologia previamente descrita na literatura. Em nosso estudo, as pacientes portadoras de endometriose apresentaram a mediana de idade inferior à de mulheres do grupo controle. Entre as possíveis explicações, consideramos que: (i) a doença ginecológica mais prevalente, a miomatose uterina, tem seu pico de incidência mais tardiamente quando comparado com a endometriose (HOFFMAN *et al.*, 2013), conseqüentemente, a busca por avaliação devido a seus possíveis sintomas ocorrem mais tardiamente; (ii) as conseqüências negativas que a endometriose tem na vida de suas portadoras são mais intensas quando comparada a demais patologias ginecológicas benignas, o que acarreta a necessidade de procura de assistência médica mais precocemente.

As informações a respeito do estado civil das mulheres portadoras de endometriose são conflitantes (NNOAHAM *et al.*, 2011; CHAPRON *et al.*, 2016) e nosso estudo não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos neste parâmetro. Complementarmente, estudos anteriores demonstraram que as mulheres acometidas pela endometriose possuem grau de escolaridade superior às mulheres não portadoras de endometriose. No ELBE, essa superioridade também foi observada, com 62,30% das participantes com ensino superior. Mas, considerando a população de participantes relativamente pequena e composta de mulheres atendidas somente na saúde suplementar, esses dados podem estar enviesados e podem não representar a realidade brasileira.

Considerando que a endometriose é uma patologia estrogênio-dependente e que o risco de desenvolvê-la está associado a índices de IMC mais baixos, a compreensão da exata patogênese desta doença se faz necessária (NNOAHAM *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2020; CHAPRON *et al.*, 2016). Mas, assim como na literatura vigente, o IMC das portadoras de endometriose do ELBE foi menor do que as mulheres do grupo controle, com diferença estatisticamente significativa.

Na parte clínica, é conhecido que os sintomas algícos não são apenas mais frequentes nas mulheres portadoras de endometriose, são também mais intensos, quando comparados a mulheres sem endometriose (CHAPRON *et al.*, 2016; BERNUIT *et al.*, 2011). Os sintomas que mais estão associados à presença de endometriose são dismenorreia (especialmente se intensa), dispareunia profunda e dor pélvica crônica. O relato de múltiplos sintomas associados a esta doença aumenta a chance de seu diagnóstico (ESHRE, 2022). Nossos dados corroboram a literatura mundial, porque, dentre as mulheres portadoras de endometriose, foram observadas prevalências aproximadas de dismenorreia e dispareunia de 80% e de DPC de 60%, além mediana de pontuação 8 na escala subjetiva de dor, o que também se assemelha aos achados de Bernuit no estudo *Uterine bleeding and pain women's research study*.

As evidências atuais sugerem que o exame físico não é confiável para prever a presença de endometriose, possuindo baixa sensibilidade e especificidade, além de ser uma análise examinador-dependente (ESHRE, 2022). Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, a análise comparativa entre os grupos sobre a presença de ponto de gatilho algíco identificou sua presença em 26 participantes portadoras de endometriose e em apenas 1 participante do grupo controle. Estes dados apontam uma tendência que pode ser valiosa na definição de parâmetros clínicos na avaliação da paciente endometriótica e mais estudos devem ser realizados neste sentido.

Em relação à topografia, as lesões endometrióticas podem ser encontradas em todos os locais do corpo e sua correta distribuição anatômica não é conhecida, pois os variados estudos foram realizados sem padronização dos grupos nem das possíveis estruturas acometidas, o que impossibilita comparações e conclusões. Estima-se que de 3 a quase 40% das mulheres portadoras de endometriose tenham lesões intestinais e que 1 a 6% têm lesões no trato urinário (ARAFAH; RASHID; AKHTAR, 2021). Em um estudo retrospectivo avaliando a localização anatômica das lesões de endometriose de 1101 pacientes, Audebert *et al.* (2018) demonstraram que os sítios mais acometidos são: ovário (66,9%), ligamento uterossacro (45,5%), fossa ovárica (32,2%), fundo de saco de Douglas (29,5%), bexiga (21,4%), útero (8,5%) e sigmóide (8,4%). Os achados do ELBE divergem deste resultado e os pontos de maior acometimento encontrados no nosso estudo são peritônio parietal, ligamento uterossacro, ovários, septo retovaginal e fossa ovárica.

Em relação aos aspectos patológicos, a análise dos achados histológicos ressalta a importância do papel dos macrófagos nos processos fisiopatológicos da endometriose (SYMONS *et al.*, 2018; VALLVÉ-JUANICO; HOUSHDARAN; GIUDICE, 2019). A identificação de diferença significativa entre a EG e a ENG pode sugerir uma ação celular específica para fases distintas da doença e uma resposta adaptativa mais relevante nos estágios mais avançados da endometriose, explicando a identificação menos frequentes dos macrófagos nesta situação clínica. No entanto, é importante salientar que a gravidade da apresentação das lesões não tem correlação com o tempo de evolução da doença e a identificação de concentrações elevadas de macrófagos no grupo de EG não seja exatamente uma discrepância, mas um sinalizador de agressividade do processo. Nosso estudo não foi desenhado para avaliação desta hipótese e mais estudos serão necessários para maior esclarecimento destas interações.

Também, não é possível definir os mecanismos que justificam a identificação mais frequente de hemorragia no estroma do endométrio ectópico nas pacientes nas pacientes do grupo de ENG. Em nossa amostra este achado esteve presente em 2 pacientes do grupo EG e em 8 do grupo ENG. Entendemos a endometriose como uma doença com diferentes formas de apresentação, associada a lesões com diferentes características morfológicas e onde o papel da fibrose tecidual é cada vez mais discutido (VIGANO, 2017), poderíamos mais uma vez atribuir estes achados a diferenças relacionadas a diferença no tempo de desenvolvimento da doença nos diferentes grupos.

Em nosso estudo, identificamos que a presença das células linfóides e macrófagos foram maiores no endométrio ectópico quando comparado com eutópico, em participantes do grupo ENG. É conhecido o fato de que, para o desenvolvimento de tecido endometrial na cavidade peritoneal, não basta apenas a presença destas células fora de seu local de origem. É necessária a ocorrência de inúmeros processos, envolvendo a migração de variados tipos celulares e liberação de diversos mediadores imunológicos (SYMONS *et al.*, 2018; VALLVÉ-JUANICO; HOUSHDARAN; GIUDICE, 2019). Por isso, é esperada a existência de mais infiltrados celulares no endométrio ectópico quando comparado ao eutópicos de pacientes com endometriose no momento de desenvolvimento das lesões endometrióticas.

Ao avaliar os aspectos imunológicos do sangue periférico das participantes do ELBE, examinamos os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento. Identificamos, em nosso estudo, níveis mais elevados de CCL11 no grupo EG do que no grupo Controle. É possível associar níveis séricos de CCL11 com maior gravidade das lesões endometrióticas, uma vez que esta quimiocina produzida pelas ESC está relacionada com a criação de um microambiente angiogênico, característica essencial para o crescimento e infiltração das lesões (OUYANG *et al.*, 2009).

CXCL10 é uma quimiocina do padrão TH1 que estimula a migração de células NK e as atividades citolítica destas células. Sabemos que a endometriose é uma doença que cursa com padrão de resposta TH2 na qual existe significativa disfunção das células NK (GALLERI *et al.*, 2009). Ao mensurar a quantidade de CXCL10 no sangue periférico, encontramos níveis séricos estatisticamente significativos mais baixos no grupo EG, quando comparado ao grupo ENG, conforme já apresentado em estudos anteriores e condizentes com a patogênese desta patologia. As evidências são cada vez mais favoráveis ao raciocínio de que a redução dos níveis séricos de CXCL10 auxilie no escape do endométrio ectópico da destruição no sistema imune pela ativação menor de mecanismos de citotoxicidade tanto da resposta inata quanto adaptativa, o que predispõe o desenvolvimento da endometriose e quanto menor o nível de CXCL10, menos as células NK funcionais e mais grave fica a doença (GALLERI *et al.*, 2009).

Identificamos que os valores plasmáticos de CXCL8 foram maiores no grupo ENG e menores no EG. Como a CXCL8 é um fator pró-inflamatório e neutrofílico (SYMONS *et al.*, 2018), espera-se que seu papel seja mais relevante no estabelecimento das lesões porque promove grande estímulo migratório de células inflamatórias. Foram também identificadas maiores concentrações de CCL3 no grupo ENG, indicando resposta inflamatória aguda e recrutamento e ativação de polimorfonucleares, como neutrófilos, que geralmente estão mais presentes no início do desenvolvimento das lesões endometrióticas e também linfócitos pró-inflamatórios, que poderiam estar participando da exacerbação da inflamação.

Por último, observamos IL-9 e IL-7, ambas relacionadas com proliferação celular. O papel da IL-9 na patogênese da endometriose ainda não está totalmente esclarecido e pode estar associado ao estímulo da expressão de CXCL8 (TARUMI *et*

al., 2021). O aumento dos níveis de IL-7 pode ser prejudicial ao organismo e pode induzir crescimento celular exacerbado, além da produção de citocinas inflamatórias (HANG-RAE *et al.*, 2008), substâncias essenciais para implantação e desenvolvimento do endométrio ectópico. Em nossas amostras, a IL-9 foi identificada em maior quantidade no sangue periférico das participantes do grupo ENG, quando comparado com os grupos EG e Controle, enquanto a IL-7 foi identificada em maior quantidade no sangue periférico das participantes do grupo ENG, quando comparado com grupo Controle. Estes achados não encontram paralelo em literatura por nós avaliada.

Em conjunto, os dados do estudo identificaram novos biomarcadores potenciais relacionados à imunopatogênese da endometriose que poderão ser empregados futuramente para uso clínico como biomarcadores no diagnóstico não invasivo e monitoramento da endometriose.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir que: (i) biomarcadores imunológicos podem ser ferramentas importantes no diagnóstico e monitoramento da endometriose, nossos resultados sugerem ser possível a criação de modelos de associações de marcadores capazes de distinguir pacientes com e sem a patologia, bem como diferentes estágios evolutivos da doença; (ii) o endométrio ectópico apresenta padrão histológico com diferenças marcantes em relação ao endométrio eutópico, especialmente no que se refere a células linfóides e macrófagos; (iii) aspectos clínicos das pacientes acometidas podem ser utilizados em modelos preditivos para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes endometrióticos.

Certamente mais estudos serão necessários para validar e aprimorar nossos achados e conclusões. O desenvolvimento do conhecimento nesta área pode criar ferramentas capazes de estabelecer tendências prognósticas, o que, por sua vez, poderia diminuir ações invasivas na abordagem da endometriose, otimizando a assistência, reduzindo custos e aumentando a acessibilidade do tratamento de nossos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M. S.; *et al.* AAGL2021 Endometriosis Classification: an anatomy-based surgical complexity score. **J Minim Invasive Gynecol**, v.28, n.11, p. 1941-50, nov. 2021.
- AHN, S. H.; SINGH, V.; TAYADE, C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. **Fertil Steril**, v. 107, n. 3, p. 523-32, mar. 2017.
- ARAFAH, M.; RASHID, S.; AKHTAR, M.; Endometriosis: A Comprehensive Review. **Adv Anat Pathol**, v. 28, n. 1, p. 30-34, jan. 2021.
- AUDEBERT, A.; *et al.* Anatomic distribution of endometriosis: a reappraisal based on series of 1101 patients. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.230, p.36-40, nov.2018.
- BERNUIT, D. *et al.* Female perspectives on endometriosis: findings from the uterine bleeding and pain women's research study. **J Endometr Pelvic Pain Disord**, v. 3, n. 2, p.73-85, apr. 2011.
- CARDOSO, J. V. *et al.*; Epidemiological profile of women with endometriosis: a retrospective descriptive study. **Rev Bras Saúde Mater Infant**, v. 20, n. 4, p. 1057-67, out. 2020.
- CARVALHO, L. F. P.; *et al.* Oxidative cell injury as a predictor of endometriosis progression. **Reprod Sci**, v.5, n.6, p 688-98, jun. 2013.
- CHAMIÉ, L.P; *et al.* Findings of pelvic endometriosis at transvaginal US, MR imaging, and laparoscopy. **Radiographics**, v.31, n.4, p.E77-100, 2011.
- CHANG, K.; *et al.* IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 3, p.e2666, mar. 2017.
- CHAPRON, C.; *et al.* Factors and Regional Differences Associated with Endometriosis: A Multi-Country, Case–Control Study. **Adv Ther**, v. 33, n. 8, p. 1385-407, aug. 2016.
- CHAPRON, C.; *et al.* Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 11, p. 666-682, nov. 2019.
- DMOWSKI, P. D.; BRAUN, D. P. Immunology of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 245-63, apr. 2004.
- DORIEN, F. O.; *et al.* Noninvasive diagnosis of endometriosis: Review of current peripheral blood and endometrial biomarkers. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 50, p.72-83, jul. 2018.

DUNSELMAN, G. A. J.; *et al.* ESHRE guideline: management of women with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 29, n. 3, p. 400-12, mar. 2013.

ESHRE (EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY) Endometriosis Guideline Development Group. **Endometriosis: Guideline of European Society of Human Reproduction and Embryology**. Strombeek-Bever: ESHRE, 2022. 192p. Disponível em: <https://www.eshre.eu/Guideline/Endometriosis#:~:text=ESHRE%20Guideline%20Endometriosis%20Issued%3A%20%20February%202022%20This,painful%20symp toms%20and%20for%20infertility%20due%20to%20endometriosis>. Acesso em: 06 fev 2022.

FUNG, J.N.; MONTGOMERY, G.W. Genetics of endometriosis: State of the art on genetic risk factors for endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 50, p. 61-71, fev. 2018.

GALLERI, L.; *et al.* Low serum and peritoneal fluid concentration of interferon-g-induced protein-10 (CXCL10) in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 91, n. 2, p. 331-4, fev. 2009.

GOTERI, G.; *et al.* Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor cellular expression in ovarian endometrioma. **Fertil Steril**, v. 81, n. 6, p. 1528-33, jun. 2004.

GUPTA, D.; *et al.* Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v.4, n.4, CD012165, apr. 2016.

HANG-RAE, K.; *et al.* IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. **Crit Rev Immunol**, v. 28, n.4, p. 325-29, fev. 2008.

HO, H. N.; WU, M. Y.; YANG, Y. S. Peritoneal cellular immunity and endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 38, n. 6, p. 400-12, dec. 1997.

HOFFMAN, B. L. *et al.* **Ginecologia de Williams**. 2. ed Porto Alegre: AMGH, 2013. 1424p.

HOUFACHE, K.; *et al.* Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. **Minerva Endocrinol**, v. 37, p. 75-92, mar. 2012.

IZUMI, G.; *et al.* Mannose receptor is highly expressed by peritoneal dendritic cells in endometriosis. **Fertil Steril**, v. 107, n. 1, p. 167-73, ja. 2017.

KAYISLI, U. A.; MAHUTTE, N. G.; ARICI, A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. **Am J Reprod Immunol**, v. 47, n. 4, p. 213-21, apr. 2002.

KHAN, K. N.; *et al.* Toll-like receptor system and endometriosis. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 39, n. 8, p. 1281-92, aug. 2013.

KOBAYASHI, H.; *et al.* The role of iron in the pathogenesis of endometriosis. **Gynecol Endocrinol**, v. 25, n.1, p. 39-52, jan. 2009.

KRALICKOVA, M.; VETVICKA, V. Immunological aspects of endometriosis: a review. **Ann Transl Med**, v. 3, n. 11, p. 153, jul. 2015.

LAGANA, A.S.; *et al.* Natural Killer T cell subsets in eutopic and ectopic endometrium: a fresh look to a busy corner. **Arch Gynecol Obstet**, v. 293, n. 5, p. 941-9, may. 2016.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. The gut microbiota: a puppet master in the pathogenesis of endometriosis? **Am J Obstet Gynecol**, v. 215, n. 1, p.68.e1-4, jul. 2016.

LE, N.X.H., *et al.* Alteration of systemic and uterine endometrial immune populations in patients with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v.85, n.3, p. 13362, mar. 2021.

LU, Y.; *et al.* The role of nuclear factor-kappa-B p50 subunit in the development of endometriosis. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 3, p. 591-603, jan. 2011.

MILLER, J.E.; *et al.* Interleukin-33 modulates inflammation in endometriosis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p.17903, dez. 2017.

MALHOTRA, N.; *et al.* Correlation of angiogenic cytokines-leptin and IL-8 in stage, type and presentation of endometriosis. **Gynecol Endocrinol**, v. 28, n. 3, p. 224-7, mar. 2012.

MING-QING, Li. *et al.* CXCL8 enhances proliferation and growth and reduces apoptosis in endometrial stromal cells in an autocrine manner via a CXCR1-triggered PTEN/AKT signal pathway. **Hum Reprod**, v. 27, n. 7, p. 2107-16, jul. 2012.

ODUKOYA, O.; BANSAL, A.; COOKE, I. Serum endometrial IgG antibodies and soluble CD23 concentrations in patients with endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 75, n. 10, p. 927-31, 1996.

OUYANG, Z.; *et al.* Interleukin-4 induces expression of eotaxin in endometriotic stromal cells. **Fertil Steril**, v. 94, n. 1, p. 58-62, jun. 2009.

PATEL, B. G.; *et al.* Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 50, p. 50-60, jul. 2018.

PODGAEC, S.; *et al.* Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n.1, p. 92-8, jan-fev. 2010.

REIS, F.M.; *et al.* Diagnostic value of serum activin A and follistatin levels in women with peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis. **Hum Reprod**, v.27, n.5, p.1445-50, mar. 2012.

REIS, F. M.; MONTEIRO, C. S.; CARNEIRO, M. M. Biomarkers of Pelvic Endometriosis. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 39, n. 3, p. 91-3, mar. 2017.

RICCIO, L.; *et al.* Immunology of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 50, p. 39-49, jul. 2018.

SAITO, A.; *et al.* TGF-beta1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. **Hum. Reprod**, v. 26, n. 7, p. 1892-8, jul. 2011.

SYMONS, L. K.; *et al.* The Immunopathophysiology of Endometriosis. **Trends Mol Med**, v. 24, n. 9, p. 748-762, sep. 2018.

TAKAMURA, M.; *et al.* Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 74, n. 6, p. 480-6, set. 2015.

TAKEBAYASHI, A. *et al.* Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients. **Am J Reprod Immunol**, v. 73, n. 3, p. 221-31, 2015.

UZ, Y. H.; *et al.* Increased c-Jun N-terminal kinase activation in human endometriotic endothelial cells. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, n.1, p. 83-91, jan. 2011.

VALLVÉ-JUANICO, J.; HOUSHDARAN, S.; GIUDICE, L. C. The endometrial immune environment of women with endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 25, n.5, p. 565-92, sep. 2019.

VERMEULEN, N; *et al.* Endometriosis Classification, Staging and Reporting Systems: A Review on the Road to a Universally Accepted Endometriosis Classification. **J Minim Invasive Gynecol**, v. 28, n.11, p.1822-48, nov. 2021.

WEED, J. C.; ARQUEMBOURG, P. C. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? **Clin Obstet Gynecol**, v. 23, n. 3, p. 885-93, sep. 1980.

WILD, R. A.; SHIVERS, C. A.; Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis. **AJRIM**, v. 8, n. 3, p. 84-6, jul. 1985.

WU, M.H.; *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. **Am J Pathol**, v. 167, n. 4, p. 1061-9, out. 2005.

WU, M. Y.; *et al.* Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 74, n. 6, p. 1187-91, dec. 2000.

YEOL, S. G.; *et al.* Decreased Bcl-6 and increased Blimp-1 in the peritoneal cavity of patients with endometriosis. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 42, n. 2, p. 156-60, jun. 2015.

ZONDERVAN, K. T.; *et al.* Endometriosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n.9, jul. 2018.

ZONDERVAN, K. T.; *et al.* Endometriosis. **N Engl J Med**, v.382, p. 1244-56, mar. 2020.

9. ANEXO I



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: ELBE - Estudo Longitudinal de Biomarcadores em Endometriose (Projeto Piloto)

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa desenvolvida por pesquisadores da FIOCRUZ Minas e do Hospital Felício Rocho sobre endometriose, uma afecção ou doença inflamatória que é provocada dentro do abdômen ou barriga quando células do endométrio ou da menstruação caem nos órgãos internos.

Este documento visa esclarecê-la sobre a pesquisa que será realizada, detalhando todos os procedimentos e os benefícios e riscos envolvidos. Por favor, leia as informações com atenção e fique a vontade para esclarecer todas as suas dúvidas.

Dados do Participante:

Nome:

Identidade:

Data do Nascimento:

Endereço:

Cidade:

Telefone:

A pesquisa tem como objetivo descobrir moléculas ou substâncias que estão presentes no sangue ou dentro do abdômen, na superfície dos órgãos internos, e que estão alteradas durante a endometriose, para ajudar no diagnóstico ou na detecção precoce desta doença.

Para tanto, faremos as coletas de dois tubos de sangue e de pequenos fragmentos de dentro e de fora do útero, além de pequenos fragmentos da parte de dentro do abdômen, chamada peritônio. Você poderá ser incluída no grupo de casos da doença ou no grupo do controle da doença, de acordo com o resultado dos exames que está fazendo.

Caso aceite o convite, você autorizará também a consulta e utilização de dados do seu prontuário médico e o armazenamento ou guarda das suas biópsias na FIOCRUZ Minas. Esse material biológico coletado (sangue e pequenos fragmentos) será utilizado unicamente para esta pesquisa. Se houver o interesse de utilização deste material para pesquisas futuras, você será novamente contatado para autorizar a utilização do material armazenado.



Importante lhe informar que você tem total liberdade para sair do estudo e retirar o consentimento para guarda e utilização do material biológico a qualquer momento.

Rubrica Pesquisador: _____ Rubrica Participante: _

Riscos e Benefícios

Ao participar desta pesquisa, existem riscos potenciais de mancha avermelhada (hematoma) no local da punção venosa e de pequeno sangramento e dor durante as biópsias. Esses riscos são relativamente baixos ou pequenos quando realizados e monitorados por profissionais experientes, em ambiente hospitalar.

Os riscos potenciais de perda do sigilo e da confidencialidade serão pequenos porque serão utilizadas medidas de codificação das amostras e utilização de senhas. Somente os coordenadores do estudo terão acesso irrestrito à identificação das participantes.

Com este estudo, espera-se contribuir para o diagnóstico da endometriose, um problema de saúde que afeta muito a qualidade de vida e saúde da mulher.

Direitos e Garantias

Todos os direitos e garantias abaixo serão respeitados:

- Tempo adequado para a reflexão e decisão de participar ou não da pesquisa;
- Liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma;
- Manutenção do sigilo e da privacidade;
- Acesso aos resultados dos exames;
- Esclarecimentos adicionais da pesquisa;
- Ressarcimento das despesas para a realização da pesquisa; e
- Indenização diante de eventuais danos decorrentes diretamente com a participação na pesquisa, de acordo com a legislação pertinente.

Rubrica Pesquisador: _____ Rubrica Participante: .



Informações para Contato

Você receberá uma via assinada deste Termo, onde consta o telefone do pesquisador principal. Você poderá esclarecer todas as suas dúvidas agora ou a qualquer momento durante a pesquisa. Na sua via você também encontrará o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou e do Hospital Felício Rocho. Este Comitê é o órgão responsável por garantir os interesses dos participantes da pesquisa

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal: Dra. Andréa T. Carvalho

Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte- MG, CEP:
30190-002 Tel.: (31) 3349 XXXX, Email: andrea.carvalho@fiocruz.br

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz Minas

Secretaria: Bernadete Patrícia Santos

Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte-MG, CEP: 30.190-002

Tel: (31) 3349 7825, E-mail: bernadet@minas.fiocruz.br

Horário de Atendimento: 09:00h às 17:00h, de segunda a sexta-feira

Endereço e telefone do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Felício Rocho

Secretaria: Luciana Pedroso Gomes

Av. do Contorno, 9530, 5o andar, Barro Preto, Belo Horizonte-MG, CEP: 30110-934

Tel: (31) 3514 7626, E-mail: cep@feliciorocho.org.br

Horário de Atendimento: 08:00h às 17:00h, de segunda a sexta-feira

Assinatura do Participante

Assinatura da Testemunha ou Responsável

Eu, _____(nome do pesquisador), comprometo-me a cumprir todas as exigências e responsabilidades a mim conferidas neste Termo.

Assinatura do Pesquisador

Local: _____ Data: _____