

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA

Vânia Teixeira de Andrade

Níveis de interleucina-6 e expressão gênica na endometriose

Porto Alegre

2015

Vânia Teixeira de Andrade

Dissertação para a obtenção do título de Mestre apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Débora M. Morsch

Porto Alegre

2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Andrade, Vânia Teixeira de  
Níveis de interleucina-6 e expressão gênica na  
endometriose / Vânia Teixeira de Andrade. -- 2015.  
49 f.

Orientadora: Débora Martinho Morsch.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,  
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. endometriose. 2. interleucina-6. 3. tecido  
adiposo. 4. expressão gênica. 5. fluido peritoneal.  
I. Morsch, Débora Martinho, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família pelo estímulo e apoio constantes e pela confiança.

Agradeço ao meu amor, Leandro por estar sempre presente. Obrigada pela compreensão quando estive ausente e paciência nas horas difíceis. Obrigada por me estimular a crescer sempre.

Agradeço a minha pequena Manuela, que surgiu nas nossas vidas no meio desta jornada e, mesmo sem saber, hoje é a razão das minhas escolhas. Desculpe por não poder estar ao teu lado em alguns momentos.

Agradeço a minha mãe, com todo seu amor e dedicação, que abriu mão da sua vida para cuidar da minha filha quando não pude estar presente. Obrigada por me apoiar nas minhas escolhas.

Agradeço ao meu pai pelo apoio de sempre, que, a cada passo na minha vida profissional, faz questão de demonstrar o orgulho que sente. Saiba que isso só me encoraja a seguir adiante.

Agradeço a minha irmã Vanize, que mesmo de longe, acredita e torce por mim.

Agradeço a minha querida amiga Profa. Dra. Sheila B. Lecke que, além da família, foi quem mais me estimulou a entrar para a vida acadêmica, chegando a passar uma noite em claro para me auxiliar com as referências do meu projeto. Isso jamais esquecerei.

Agradeço a minha querida bolsista Nathália Cruz da Costa, que tanto me ensinou e fez por mim no Laboratório de Endocrinologia. Também nunca vou te esquecer.

Agradeço a Profa. Dra. Andréa Prestes Nácul, que realizou a seleção de pacientes, videolaparoscopias e coletas das amostras para a realização do projeto.

Agradeço a Profa. Dra. Poli Mara Spritzer que, durante o período em que participei do grupo de pesquisa como responsável pelas coletas de sangue para os diferentes projetos, inúmeras vezes me estimulou a ingressar no mestrado, e durante esta jornada, muito me assessorou com todo seu conhecimento e experiência. Obrigada pelo exemplo, dedicação, compreensão e confiança.

Agradeço a Miriam Santa Helena e Natália Goulart por estarem sempre disponíveis.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para tornar este sonho realidade.

E, por fim, a quem devo enorme gratidão, minha querida orientadora, Profa. Dra. Débora Martinho Morsch, obrigada pelo exemplo, dedicação, paciência e entrega. Obrigada pela amizade, compreensão e solidariedade que tivestes comigo quando mais precisei. Minha homenagem a você.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Endométrio Humano.....	16
1.2 A Endometriose.....	17
1.3 Aspectos imunológicos e inflamatórios da endometriose .....	20
1.3.1 Aspectos inflamatórios da endometriose.....	20
1.3.2 Citocinas, Interleucinas e Interleucina 6.....	21
1.4 Objetivos.....	25
1.4.1 Objetivo Geral.....	25
1.4.2 Objetivos Específicos.....	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 Pacientes.....	27
2.2 Protocolo de estudo.....	27
2.3 Dosagens hormonais.....	28
2.4 Medições de IL6 no soro e fluído peritoneal.....	28
2.5 Análise da expressão gênica.....	28
2.3 Análise Estatística.....	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	31
4 ARTIGO ORIGINAL .....	36

## RESUMO

A endometriose é um distúrbio ginecológico benigno, crônico e inflamatório definido pela presença de glândulas e estroma endometriais fora do sítio normal. Alterações inflamatórias e imunológicas nos níveis celular e molecular na endometriose podem contribuir para a sobrevivência e crescimento do implante endometriótico e uma variedade de citocinas e fatores de crescimento podem desempenhar este papel no desenvolvimento da doença, embora sua etiologia ainda seja desconhecida. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos e no fluido peritoneal (FP) e a expressão gênica da interleucina-6 (IL6) em tecido adiposo (TA) subcutâneo e visceral e de focos endometrióticos de mulheres com endometriose pélvica e compará-las com mulheres hígdas. Foram incluídas no estudo 31 mulheres com endometriose e 18 mulheres com pelve normal. A endometriose foi diagnosticada por videolaparoscopia ou confirmada por exame histológico. Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas imediatamente antes da laparoscopia, e o FP, imediatamente após ter iniciado o procedimento. Biópsias de TA e tecido endometrial eutópico e ectópico foram coletados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real. O TA subcutâneo e visceral de pacientes com endometriose não mostrou diferença nos níveis de expressão gênica de IL6 quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, a expressão gênica foi similar em tecido endometrial eutópico e ectópico de pacientes com endometriose comparadas ao grupo com pelve normal. Não houve associação dos níveis de expressão gênica no TA com o grau de endometriose e tipo de lesão. Contudo, os níveis de IL6 no FP foram significativamente maiores no grupo endometriose em relação ao controle. Além disso, os níveis de IL6 foram maiores no grupo de pacientes com estágio III/IV da doença em relação ao estágio I/II ou pacientes controles. Uma correlação positiva da IL-6 no LP e o escore da severidade da doença também foi observada ( $r$ -ASRM,  $RS= 0.77$ ;  $p=0.0001$ ). Nossos achados sugerem que a IL6 pode estar associada com a endometriose pélvica e sua severidade. Estudos adicionais deverão esclarecer se a expressão da proteína da IL6 está

alterada no endométrio eutópico e ectópico e o papel desempenhado por esta citocina na patogênese da endometriose.



## ABSTRACT

Endometriosis is a gynecological benign disorder, chronic inflammatory and defined by the presence of endometrial glands and stroma outside the normal site. Inflammatory and immunological changes in the cellular and molecular levels in endometriosis may contribute to the survival and growth of endometriotic implants and a variety of cytokines and growth factors can play this role in the development of the disease, although its etiology is still unknown. The objective of this study was to evaluate serum levels and peritoneal fluid (PF) and eutopic and ectopic the gene expression of IL6 in subcutaneous and visceral adipose tissue (AT) and endometriotic tissue of women with pelvic endometriosis and compare them with healthy women. Were included in the study 31 women with endometriosis and 18 women with normal pelvis. Endometriosis was diagnosed by laparoscopy or confirmed by histological examination. Peripheral venous blood samples were collected immediately before the laparoscopy and the PF immediately after having started the procedure. Adipose tissue biopsies and endometrial tissues were collected for evaluation of gene expression by real-time RT-PCR. Adipose tissue subcutaneous and visceral of patients with endometriosis showed no difference in gene expression levels of IL6 when compared to the control group. Similarly, the gene expression was similar in eutopic and ectopic endometrial tissue of patients with endometriosis compared to the group with normal pelvis. No association was observed in levels of gene expression in AT with the degree of endometriosis and type of injury. However, the levels of IL6 on the PF were significantly higher in endometriosis group relative to the control. In addition, the IL6 levels were higher in the group of patients with stage III/IV of the disease in relation to the stage I/II or patients controls. A positive correlation of IL6 on the PF and the score of the severity of the disease was also observed ( $r$ -ASRM,  $RS = 0.77$ ;  $p = 0.0001$ ). Our findings suggest that IL6 may be associated with pelvic endometriosis and its severity. Additional studies will clarify if the expression of IL6 protein is changed in endometrium and ectopic and eutopic the role played by this cytokine in the pathogenesis of endometriosis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASRM - *American Society for Reproductive Medicine*

EDTP - Endometriose Pélvica Profunda

FP - Flúido peritoneal

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio de Liberação de Gonadotrofina

IL1-Interleucina-1

IL1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$

IL6 - Interleucina-6

IL8 - Interleucina-8

IL10 - Interleucina-10

IL12- Interleucina-12

IMC - Índice de Massa Corporal

LH - Hormônio Luteinizante

MMP - Matriz de Metaloproteinase

mRNA - Ácido desoxirribonucleico mensageiro

PCR – Proteína C Reativa

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Transformador tipo beta

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1:** Concentrações de IL6 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose (n=25) e pacientes com pelve normal (grupo controle, n=16, p=0,047, Mann-Whitney U) (A) e estratificação de acordo com os estágios da endometriose usando a classificação revisada pela *American Society for Reproductive Medicine*<sup>1</sup> (B), \*p<0.001.....  
...46

**Figura 2:** Associação entre IL6 no fluido peritoneal e o escore r-ASRM em pacientes com endometriose (rs=0.77; p<0.001)..... 47

**Figura 3:** Expressão gênica da IL6 no tecido adiposo (TA) visceral e subcutâneo (A) e tecido endometrial (B) em controles e pacientes com endometriose.....4  
8

**Tabela 1:** Distribuição de pacientes com endometrioses e pacientes com pelve normal (grupo controle) de acordo com níveis séricos de estradiol e progesterona nas fases do ciclo menstrual.....4  
9

**Tabela 2:** Concentrações séricas de IL6 em pacientes com endometrioses e pelve normal (grupo controle).....50

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Endométrio humano

O endométrio é a camada interna do útero e se renova mensalmente pela menstruação. Ele é constituído por epitélio e lâmina própria, contendo glândulas tubulosas simples que podem se ramificar em suas porções mais profundas até o miométrio, sendo rica em células e com grande quantidade de material intercelular amorfo. Possui duas camadas principais: camada basal, que é formada por estroma celular denso e sem modificações significativas durante o ciclo menstrual, e camada funcional, que se prolifera a cada ciclo menstrual e descama parcialmente durante a menstruação. Para que o ciclo menstrual ocorra, é necessária a ação do sistema hormonal feminino, formado pela interação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. Neste eixo interagem coordenadamente o Hormônio de Liberação das Gonadotropinas (GnRH), Hormônio Folículo-estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), e os hormônios ovarianos Estrogênio e Progesterona <sup>2</sup>.

O endométrio sofre modificações estruturais cíclicas constituindo o ciclo endometrial, que ocorre através da ação dos hormônios ovarianos, produzidos por estímulo da hipófise anterior. O ciclo endometrial é composto por três fases: proliferativa, secretora e menstrual. A fase proliferativa constitui a primeira fase do ciclo e é caracterizada por progressiva e intensa atividade proliferativa. Nesta fase, são os estrogênios que mantêm a proliferação das células do estroma e das células epiteliais. Na fase secretora, a progesterona inibe a ação mitogênica do estrogênio sobre o endométrio e favorece a diferenciação celular <sup>2</sup>. O principal objetivo das alterações que acontecem nesta fase é tornar o endométrio secretor e propício para receber e nutrir o óvulo fertilizado. Na fase menstrual, há a redução brusca e rápida nos níveis de estrogênio e progesterona, ocasionando a menstruação. Junto a isso, a estimulação das células do endométrio diminui e o endométrio involui para uma espessura 65% menor. A vasoconstrição, juntamente com a perda de estimulação hormonal, levará a uma necrose do endométrio e desprendimento das camadas necróticas.

## 1.2 Endometriose

A endometriose é um distúrbio ginecológico benigno comum definido pela presença de glândulas e estroma endometriais fora do sítio normal <sup>3, 4</sup>. Apesar de apresentar natureza de tumor maligno pelo fato de crescer, infiltrar-se e aderir-se aos tecidos adjacentes <sup>5</sup>, histopatologicamente é considerada uma doença benigna.

A presença e o crescimento do tecido endometrial fora da cavidade uterina ocorrem mais comumente no peritônio pélvico, nos ovários e septo retovaginal e, mais raramente, no pericárdio, pleura e sistema nervoso central, associada com dor pélvica crônica e redução de fertilidade <sup>6</sup>. Giudice & Kao <sup>4</sup>, relatam casos raros da patologia em pericárdio, pleura e até mesmo cérebro humano.

A etiologia da endometriose ainda é tema de discussão, porém, a teoria mais aceita é a da menstruação retrógrada, inicialmente proposta por Sampson na década de 1920 a qual é suportada por várias linhas de evidência científica <sup>7</sup>. Os fragmentos do endométrio uterino contidos no fluxo menstrual e na cavidade peritoneal podem exibir capacidade colonizadora ectópica, segundo esta teoria <sup>8</sup>, o que explicaria o surgimento desta doença. De acordo com Sampson, estes fragmentos se implantariam e cresceriam no peritônio e ovário provenientes do refluxo de tecido endometrial pelas trompas de falópio durante a menstruação <sup>6, 9</sup>. Os fragmentos endometriais do movimento de refluxo adeririam e invadiriam o mesotélio peritoneal com desenvolvimento de suprimento sanguíneo, levando a sobrevivência e crescimento do implante <sup>4</sup>. Esta teoria foi confirmada em um estudo <sup>10</sup> que verificou que a distribuição dos implantes endometrióticos é assimétrica e relacionada tanto com a anatomia abdominopélvica quanto com o fluxo do líquido peritoneal. Digno de nota é o fato de que cerca de 80 a 90% das mulheres em idade reprodutiva apresentam refluxo menstrual; destas 6 a 10% desenvolvem endometriose <sup>4, 11</sup>. Outras teorias como a metaplasia celômica e metástase de um fragmento ou células de uma lesão a alguma superfície propícia também tentam explicar o surgimento da endometriose, embora a causa definitiva ainda seja desconhecida, mas a teoria mais antiga e aceita é a teoria de Sampson.

A endometriose é uma doença hormônio-dependente, sendo por isso encontrada, sobretudo, nas mulheres em idade reprodutiva. As pacientes com endometriose podem ser assintomáticas, subférteis ou apresentar graus variáveis de dor pélvica. Contudo os sintomas mais frequentes são dor, dismenorréia, dispareunia e infertilidade <sup>12</sup>.

A incidência da endometriose é difícil de ser quantificada, uma vez que as portadoras da doença quase sempre são assintomáticas. Segundo Matarese *et al.* <sup>13</sup>, a endometriose pélvica afeta de 15 a 20% das mulheres em idade reprodutiva e conforme Kitawaki *et al.* <sup>5</sup> e para Giudice & Kao, <sup>4</sup>, a prevalência está em torno de 5 a 10%. Para Eskenazi <sup>14</sup>, nas mulheres assintomáticas, a prevalência varia de 2 a 22%, dependendo da população estudada. Em razão de sua relação com a infertilidade e dor pélvica, é mais prevalente nas subpopulações de mulheres com essas queixas. Nas mulheres inférteis a prevalência está entre 20 e 50%, e nas que possuem dor pélvica entre 40 e 50% <sup>14-16</sup>. Para Adamson *et al.*, <sup>17</sup>, afeta cerca de 176 milhões de mulheres em idade reprodutiva no mundo.

Diversos achados nos exames físico, de imagem e laboratoriais já podem prever, com alto grau de confiabilidade, que a paciente apresenta endometriose, embora o diagnóstico definitivo necessite de uma intervenção cirúrgica <sup>6</sup>. O padrão de referência para fazer o diagnóstico permanece a visualização das lesões por laparoscopia preferencialmente com confirmação histológica <sup>18</sup>. Na ausência de amostragem histológica, a taxa de falso-positivo com visualização laparoscópica só podem aproximar-se de 50%, especialmente em mulheres com endometriose mínima ou leve <sup>19</sup>.

A laparoscopia também permite que a endometriose seja estadiada, segundo a através de um sistema de pontuação, podendo ser classificada em graus de I a IV <sup>20</sup>. Essa classificação é a mais usada atualmente e gradua a endometriose pela extensão da doença no peritônio e ovários, bem como pela presença de aderências tubo-ovarianas e bloqueio do fundo de saco de Douglas. Porém, com algumas limitações, ela é bastante útil na orientação do tratamento pós-cirúrgico, especialmente quando a queixa da paciente é infertilidade <sup>6</sup>. Assim, com base em sua aparência laparoscópica, a

endometriose pode se classificar em: Estágio I – mínima; Estágio II – leve; Estágio III – moderada ; Estágio IV – grave.

Entretanto, é reconhecido que o estágio/extensão da doença pode não se correlacionar com os sintomas <sup>17</sup>.

Clinicamente, três entidades diferentes de endometriose também podem ser distinguidas: endometriose peritoneal, endometriose ovariana e endometriose pélvica profunda<sup>21</sup>. A endometriose pélvica profunda (EDTP) é definida como a infiltração de tecido endometriótico em estruturas ou abaixo do peritônio como no ligamento útero-sacral, reto, septo reto-vaginal ou bexiga<sup>22, 23</sup>, causando sintomas como dor pélvica, dismenorrea, dispareunia profunda, disquesia ou disúria<sup>21</sup>. Também tem sido definida como endometriose retovaginal ou adeniose do septo retovaginal.

A endometriose peritoneal apresenta três tipos distintos de lesões: as vermelhas, as escuras e as brancas. Nas lesões vermelhas, os implantes endometrióticos são mais recentes, e o endométrio é funcionante, cíclico e ativo. Nas lesões escuras existem áreas inflamatórias em processos de remodelamento e necrose celular, com acúmulo de debris e hemossiderina. As lesões brancas são as mais antigas, já densas e fibrinosas<sup>21</sup>.

A endometriose é subdiagnosticada e isto está associado a uma latência média de 6-7 anos entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo <sup>24</sup> em parte devido à exigência do diagnóstico cirúrgico <sup>9</sup>. A desordem representa uma das principais causas de histerectomia e internação nos Estados Unidos <sup>25</sup>. A significativa preocupação com a saúde pública e individual associada com a endometriose reforça a importância do entendimento da patogênese e fisiologia em direção a prevenção e ao desenvolvimento de ensaios diagnósticos sensíveis não cirúrgicos e tratamentos <sup>9</sup>.

Os tratamentos para endometriose envolvem a administração de androgênios, agonistas GnRH, progestinas e/ou contraceptivos orais. Entretanto, os medicamentos para diminuir as concentrações circulantes de estrogênios não podem ser usados continuamente devido aos possíveis efeitos adversos (como osteoporose e risco à doença cardiovascular) ou a pretensão de gravidez. Para o tratamento da dor, as pacientes são submetidas a cirurgias frequentes, embora sejam desaconselhadas por aumentarem a chance de

aderências peritoniais. Para Giudice e Kao (2004), cerca de 75% das pacientes apresentam recidiva dos sintomas dois anos após a cirurgia. Quanto mais avançado o estágio da endometriose ao primeiro diagnóstico, maior a recorrência da detecção clínica da doença <sup>26</sup>.

### **1.3 Aspectos imunológicos e inflamatórios da endometriose**

#### **1.3.1 Aspectos Inflamatórios da Endometriose**

Na mulher com endometriose, o endométrio eutópico apresenta características específicas que favorecem sua adesão, crescimento e manutenção fora da cavidade uterina <sup>27</sup>. Acredita-se que as alterações inflamatórias e imunológicas nos níveis celular e molecular na endometriose podem contribuir para a sobrevivência e crescimento do implante endometriótico, podendo afetar a fertilidade e causar dor crônica com o começo da reação inflamatória local <sup>8</sup>. É provável que um ambiente imune alterado na cavidade peritoneal com uma variedade de citocinas e fatores de crescimento derivados de macrófagos ativados, células de endometriose e células mesoteliais na cavidade abdominal de mulheres com endometriose possam desempenhar este papel no desenvolvimento da doença, embora sua etiologia ainda seja desconhecida <sup>28, 29, 30, 31</sup>.

A proliferação e/ou diferenciação celular do endométrio são acompanhadas da indução de inúmeras proteínas e/ou citocinas (fatores de crescimento, de transformação e de angiogênese, interleucinas, interferons). Estas, mediam a ação hormonal sobre a estrutura e a função endometrial e podem atuar de forma sinérgica, ou não, com os esteróides. Os estrogênios atuam como agentes pró-inflamatórios, enquanto a progesterona exerce uma potente resposta antiinflamatória <sup>32</sup>. Davies *et al.*<sup>33</sup>, indicaram que a progesterona é capaz de induzir a expressão de citocinas antiinflamatórias, sendo uma potente moduladora das respostas inflamatórias.



As doenças crônicas são acompanhadas pelos processos inflamatórios e a presença de inflamação pode preceder o futuro desenvolvimento destas doenças, segundo resultados de vários estudos<sup>34, 35</sup>.

### 1.3.2 Citocinas, Interleucinas e Interleucina 6

Existem diversos marcadores associados com a inflamação e podem ser divididos em categorias, como: 1) citocinas pró-inflamatórias; 2) citocinas antiinflamatórias; 3) adipocinas; 4) chemocinas; 5) marcadores de inflamação derivados de hepatócitos; 6) marcadores de consequência da inflamação; e 7) enzimas<sup>36</sup>.

Citocinas são peptídeos reguladores produzidos por vários tipos de células nucleadas no organismo e atuam como reguladores pleiotropicos em muitos tipos celulares. Leucócitos, incluindo macrófagos, são importantes produtores de citocinas<sup>7</sup>.

Os níveis de citocinas não refletem diretamente o estado imune, mas demonstram a ativação do sistema imune subjacente<sup>37</sup>. A resposta inflamatória está associada à liberação de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda<sup>38, 39</sup>. As citocinas pró-inflamatórias de maior relevância são: a interleucina-6 (IL6), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-8 (IL8), a interleucina-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e as CD40 e CD40L<sup>36</sup>. O TNF- $\alpha$ , IL1 e IL6 são os maiores mediadores da resposta de fase aguda em humanos<sup>40</sup>. Os dois primeiros são responsáveis pela atividade das manifestações extrahepáticas como febre, elevação das prostaglandinas, taquicardia e catabolismo acelerado. A IL6 é primariamente responsável pelo componente da resposta hepática, resultando na síntese de proteínas de fase aguda e proteína C reativa, e ativação de citocinas imunossupressoras, de função regulatória, como a Interleucina-10 (IL10)<sup>38, 39</sup>. Segundo Carmona *et al.*<sup>31</sup>, a IL6 é uma citocina derivada de células T com atividade estimuladora de células-B. A IL6 é uma citocina pleiotrópica que desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual<sup>41</sup>. A IL6 primeiramente foi descoberta durante a investigação da resposta imune e hematopoiese. Como produto da diferenciação terminal da

reação imunológica humoral, a IL6 tem sido reconhecida como elemento fundamental para a evolução das células plasmáticas <sup>29</sup>.

A IL6 é a principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas estimuladas pelo fígado de fibrinogênio, proteína amilóide sérica A (SAA), e em especial, da proteína C reativa (PCR) <sup>42, 43</sup>. Indivíduos com níveis aumentados de PCR (> 1,35 µg/mL) apresentaram valores aumentados de IL6 (3,22 pg/mL), quando comparados com indivíduos com níveis baixos de PCR (< 1,35 µg/mL), que apresentaram valores baixos de IL6 (1,35 ng/mL). Este efeito pode ser, em parte, por causa da estimulação da PCR pela IL6 <sup>42</sup>.

Em mulheres saudáveis, níveis séricos de IL6 acima de 2,05 pg/mL são considerados elevados, correspondendo ao maior quartil ou percentil 75<sup>19</sup>. Já em indivíduos com doença cardíaca, os níveis séricos aumentaram de modo bem expressivo. Pacientes com falência cardíaca crônica, que tinham níveis séricos de IL6 no maior quartil (29,71 pg/mL) apresentaram risco relativo de 2,11 para óbito dentro de 24 meses<sup>44</sup>. Dessa forma, níveis desta citocina podem prever morbidade em pessoas saudáveis e mortalidade em pessoas que já apresentaram algum evento cardiovascular <sup>41</sup>.

Fatores relacionados a cada paciente podem modificar a resposta inflamatória <sup>45</sup>. Doenças de características imunológicas como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, diabetes melito e asma brônquica podem alterar os níveis séricos de IL6 <sup>46</sup>. O uso de medicamentos de características imunossupressoras ou anti-inflamatórias, como corticosteroides, geralmente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas ou imunológicas, modificam a resposta imunológica celular e humoral, o que compromete a análise sérica de marcadores inflamatórios nesses pacientes<sup>45</sup>. A neoplasia maligna pode produzir citocinas inflamatórias como IL6 e TNF- $\alpha$  que podem agir como fatores de crescimento tumoral, comprometendo o estado imunológico do paciente, com maior grau de imunossupressão em pacientes submetidos à laparotomia por câncer em comparação àqueles submetidos à laparotomia por doença benigna <sup>46, 47</sup>.

Um aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, adipocinas e outros marcadores inflamatórios pode ser evidenciado na obesidade, que é caracterizada pela ativação de processos inflamatórios em locais metabolicamente ativos, como o fígado, tecido adiposo e células imunes<sup>48</sup>. Também no trauma cirúrgico, a inflamação é induzida por mediadores pró-inflamatórios como IL6, PCR, dentre outros, e por mediadores anti-inflamatórios, como IL10 e prostaglandina E consideradas imunodepressores e demonstrando imunorregulação<sup>37,49,84</sup>. Em seu estudo, Siveira *et al* (2012) correlacionaram a dosagem sérica pré-operatória e pós-operatória de IL6 e IL10 entre pacientes submetidos à colecistectomia laparotômica versus videolaparoscópica, evidenciando aumento das dosagens de IL6 e IL10 após o trauma cirúrgico. Ocorreu aumento significativo dos níveis das interleucinas analisadas no grupo laparotômico em comparação com o grupo laparoscópico. A IL6 e a IL10 são mediadores utilizados na resposta inflamatória após trauma cirúrgico. Sabe-se ainda que ambas possuem efeito de autorregulação, sendo que o aumento de IL6 reflete aumento concomitante de IL10<sup>49</sup>.

A idade modifica os níveis plasmáticos de IL6. Com o seu avanço, ocorre aumento nos níveis séricos da citocina devido, em parte, às doenças associadas e ao decréscimo dos hormônios sexuais<sup>46</sup>.

No endométrio, as citocinas são envolvidas com o processo de receptividade ao embrião e com preparo para a descamação uterina menstrual. A expressão desregulada de citocinas pró-inflamatórias no endométrio tem sido associada com redução de fertilidade e ocorrência de aborto<sup>8</sup>.

É geralmente aceito que uma expressão anormal de citocinas pode desempenhar um papel na patogênese da endometriose, embora uma relação precisa entre o aumento da inflamação e o desenvolvimento da endometriose seja desconhecido. O aumento da inflamação peritoneal, evidenciado pelo aumento do volume do fluido peritoneal (FP) e da concentração das células brancas do sangue no FP e citocinas inflamatórias tem sido reportada na mulher com endometriose<sup>29</sup>.

Macrófagos presentes na cavidade peritoneal são potentes produtores de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL6. Fatores de crescimento estão envolvidos no controle de implantação e crescimento das células endometriais fora do útero<sup>50-52</sup>. Segundo Salmassi *et al.*,<sup>29</sup> os níveis de IL6 encontraram-se aumentados

no FP de pacientes inférteis com endometriose ativa. A IL6 é liberada por macrófagos que também são sintetizados por células ectópicas endometriais, e está envolvida na regulação da atividade da aromatase em fibroblastos de tumores derivados de mama e células estromais derivadas de endometriose<sup>53</sup>.

Estudos anteriores<sup>54, 55, 56, 57</sup> indicam que o soro e / ou os níveis peritoneais de algumas citocinas (por exemplo, IL-10 e interleucina 12 (IL-12)) podem ser aumentados, o que demonstra uma resposta inflamatória não específica na endometriose<sup>31</sup>. Mais recentemente, algumas citocinas vêm sendo estudadas como novos marcadores não cirúrgicos da endometriose<sup>6</sup>. A IL6 parece ter um desempenho melhor do que outras citocinas em discriminar pacientes com endometriose<sup>58</sup>. Ela desempenha um importante papel na reprodução, isto é, na foliculogênese, na produção de hormônios esteróides e eventos de implantação e como reguladora de crescimento das células endometriais. Envolvida em numerosos processos imunológicos e proliferativos, tem sido encontrada em altas concentrações no FP de pacientes com endometriose<sup>29</sup>.

O papel da IL6 na patogênese de endometriose tem sido extensivamente estudado, mas os níveis de IL6 detectada tanto no FP como no soro de pacientes com endometriose têm sido inconsistentes<sup>59, 60</sup>. No entanto, o aumento da expressão de IL6 mRNA no ovário foi relatado<sup>61</sup>.

O aumento da produção dos fatores de crescimento no FP é acompanhado por uma elevação de IL6 e IL8 no sangue periférico de pacientes com endometriose<sup>31, 62</sup>. Segundo Yoshino *et al.*<sup>28</sup>, a secreção anormal destas citocinas, e da proteína quimiotrativa-1 de monócitos desempenha um papel na modulação da resposta inflamatória no tecido endometrial.

Um perfil de expressão gênica do peritônio de indivíduos com e sem endometriose demonstraram regulação alta de matriz de metaloproteinase (MMP) -3 durante a fase lútea e a sobre-regulação da expressão de ICAM-1, o fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- $\beta$ ), e IL6 durante a fase menstrual<sup>63</sup>. A expressão diferencial destas citocinas e fatores de crescimento podem criar um microambiente que incentiva a implantação de células do endométrio ou protege-os de remoção imunomediada<sup>9</sup>.

Os níveis séricos de IL6 também demonstraram ser mais elevados em pacientes com endometriose em comparação com mulheres saudáveis<sup>62</sup>. O

derrame menstrual contém diversos tipos de células, incluindo as glândulas endometriais, células estromais, células endoteliais e células do sangue. Estas células não são capazes de sobreviver fora da cavidade uterina em condições normais, e são removidos por meio do sistema imune inato. No entanto, as propriedades destas células em pacientes que desenvolvem a endometriose podem ser alteradas para permitir a sobrevivência completamente com mecanismos ainda indefinidos <sup>64</sup>.

Ainda não está claro se anormalidades imunológicas são um efeito da endometriose ou se eles estão associados com a progressão da doença. Estudos anteriores investigaram perfis de citocinas no FP e / ou no sangue periférico de mulheres com endometriose profunda e superficial concluíram que os marcadores de inflamação peritoneal são elevados em mulheres com estágio mínimo para leve, mas não em estágio de moderado a grave de endometriose, e citocinas inflamatórias foram correlacionadas inversamente com o estágio da doença e a profundidade da invasão <sup>65, 66 56, 67 , 31</sup>.

No entanto, outros relatos têm mostrado que não houve diferenças significativas nos níveis de citocinas no sangue periférico e FP entre as mulheres com endometriose infiltrativa profunda e mulheres com doença superficial <sup>31, 68, 69 70</sup>. Esses resultados contraditórios justificam claramente mais estudos que investigam o papel dos perfis de citocinas nos diferentes tipos de lesões de endometriose <sup>31</sup>.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo geral**

- Avaliar os níveis séricos e do fluído peritoneal e níveis de expressão gênica da IL6 em tecido adiposo e de focos endometrióticos de mulheres com endometriose pélvica e compará-las com mulheres sem a doença.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os níveis de expressão gênica da IL6 no tecido adiposo e endometrial em associação com os níveis de IL6 sérica e do fluído peritoneal.

- Avaliar a associação dos níveis de IL6 com o grau e o tipo de lesão endometriótica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Pacientes

Este estudo envolveu pacientes que se submeteram a laparoscopia ginecológica da Unidade de Reprodução Humana do Hospital Fêmeina e que tiveram o diagnóstico confirmado durante o procedimento. Pacientes sem evidência de doença pélvica, segundo a laparoscopia e exames histopatológicos, foram incluídas no grupo controle (pelve normal). Durante 18 meses, de setembro de 2007 a março de 2009, 31 mulheres com endometriose e 18 mulheres com pelve normal foram incluídas no estudo. Infertilidade foi definida como ausência de gravidez após um ano de relações sexuais sem contracepção <sup>71</sup>. Dor pélvica crônica foi definida como dor pélvica não cíclica durante seis meses no mínimo e suficientemente grave para causar limitações ou solicitar tratamento médico <sup>72</sup>. A endometriose foi diagnosticada se implantes endometrióticos foram vistos durante a laparoscopia ou confirmados por exame histológico de locais com sinais sugestivos de endometriose ativa.

Os critérios de inclusão foram: (1) pacientes em pré-menopausa (idade - 21 a 50 anos) e (2) que não tinham recebido hormônios por um período de 3 meses antes do surgimento dos sintomas.

Os critérios exclusão foram: mulheres com índice de massa corporal (IMC) acima de 35. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local e o consentimento livre e esclarecido escrito foi obtido de todas as participantes.

### 2.2 Protocolo de estudo

Todas as mulheres foram submetidas a exames clínicos, incluindo medidas de peso e altura e cálculo do IMC. Todas as laparoscopias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, que diagnosticou e estadiou a endometriose de acordo com a classificação revisada da *American Society for Reproductive Medicine* <sup>20</sup>.

Os procedimentos foram realizados preferencialmente na fase secretora do ciclo (42,86%), mas algumas pacientes foram incluídas na fase proliferativa (22,45%). Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas imediatamente antes da laparoscopia, e o fluido peritoneal (FP), imediatamente

após ter iniciado o procedimento. As amostras foram armazenadas em gelo até o processamento no laboratório. Componentes celulares do sangue e FP foram removidos por centrifugação a 300 rpm por 20 minutos. Alíquotas foram coletadas e armazenadas a -80 graus para posterior processamento das análises.

As datas da fase do ciclo menstrual foram confirmadas por exame histológico e definidas de acordo com o critério descrito por Noyes et al <sup>73</sup>. Em duas pacientes as biópsias endometriais foram insatisfatórias, e uma paciente foi a histerectomia antes do estudo ser completado. Amostras de tecido adiposo subcutâneo e visceral (aproximadamente 1cc) também foram coletadas da região pélvica antes de finalizar o procedimento videolaparoscópico.

### **2.3 Dosagens hormonais**

Concentrações séricas de estradiol e progesterona foram analisadas pelo método de eletroquimioluminescência (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) a um limite de detecção de 5,0 pg/ml e coeficientes de variação intra e interensaio abaixo de 5%.

### **2.4 Medições de IL6 no soro e fluido peritoneal**

Níveis de IL6 foram determinados utilizando-se imunoensaio enzimático (Assay Designs, Inc, Michigan, USA) com limite de detecção de 3,91 pg/mL. Os coeficientes de variação inter e intraensaio foram 5,3% e 12,4%, respectivamente.

### **2.5 Análise de expressão gênica**

*Isolamento de RNA.* Amostras de RNA total de cada tecido foram extraídas utilizando-se o método do Trizol (Trizol, Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA) de acordo com a descrição do fabricante. A qualidade e concentração do RNA total extraído foram avaliadas utilizando-se espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).



*Potocolo de Transcrição Reversa e da Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR).*

Um micrograma de RNA total foi reversamente transcrito em cDNA utilizando o sistema de síntese de primeira fita (Superscript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, em termociclador (PCT-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). A PCR em tempo real foi realizada em triplicata na em termociclador ViiA-7 real-time PCR System (Life Technologies, CA, USA) onde as amostras foram aquecidas por 10 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 95 °C por 15s e 60°C por 1 min. Os experimentos foram realizados através do monitoramento em tempo real e aumento na fluorescência de SYBR Green dye, como anteriormente descrito <sup>74</sup> (Higuchi, 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, <sup>75</sup>. Os primers foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express 3.0 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e adquiridos pela Invitrogen (Life Technologies, Foster City, CA, USA). A sequência de primers de IL6 sense e antisense (NM\_000600) foi respectivamente 5'CCACACAGACAGCCACTCA3' e 5'CATCCATCTTTTTTCAGCCATCT3'. O gene GAPDH (NM\_001256799) foi usado para normalizar a quantificação do mRNA com sequências respectivamente sense e antisense 5'ACCCACTCCTCCACCTTTG3' e 5'CTCTTGTGCTCTTGCTGGG3'. Amostras de cDNA (1.0ng/ $\mu$ L) foram misturados com um volume de primer predeterminado sense e antisense (1.0 e 1.0 $\mu$ L for IL-6, 0 e 0.5 e 0.5 $\mu$ L for GAPDH) e 5.0 $\mu$ L de Fast SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um total de 10.0 $\mu$ L. As condições do protocolo consistiram de desnaturação a 95 °C por 20 segundos seguido por 50 ciclos (5s a 95 °C e 20s a 60 °C). Dados foram analisados por quantificação relativa usando o método do  $\Delta\Delta CT$  <sup>76, 77</sup>. A validação dos ensaios para o tecido adiposo e endométrio foi realizada por amplificação dos genes alvo e referência, separadamente, usando diluições em série de uma amostra de mRNA. Ambos mRNA alvo e referência exibiram igual eficiência de amplificação.

## **2.6 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. Comparações entre os dois grupos foram analisadas usando o teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney, conforme apropriado. O teste qui-quadrado foi usado para comparar variáveis qualitativas. Os testes de correlação de Pearson ou de Spearman foram usados para variáveis com distribuição Gaussiana e não-Gaussiana, respectivamente.

Todas as análises foram realizadas usando pacote estatístico SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility* 1997;67:817-21.
2. GURATES B, BULUN SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Seminars in reproductive medicine* 2003;21:125-34.
3. COMITER CV. Endometriosis of the urinary tract. *The Urologic clinics of North America* 2002;29:625-35.
4. GIUDICE LC, KAO LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
5. KITAWAKI J, KADO N, ISHIHARA H, KOSHIBA H, KITAOKA Y, HONJO H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2002;83:149-55.
6. NACUL AP, SPRITZER PM. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia* 2010;32:298-307.
7. SAMPSON JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American journal of pathology* 1927;3:93-110 43.
8. PONCE C, TORRES M, GALLEGUILLOS C, et al. Nuclear factor kappaB pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis. *Reproduction* 2009;137:727-37.
9. BURNEY RO, GIUDICE LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility* 2012;98:511-9.
10. BRICOU A, BATT RE, CHAPRON C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2008;138:127-34.
11. GROOTHUIS PG, NAP AW, WINTERHAGER E, GRUMMER R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005;8:147-56.
12. SCARSELLI G, RIZZELLO F, CAMMILLI F, GINOCCHINI L, COCCIA ME. Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. *Minerva ginecologica* 2005;57:55-78.
13. MATARESE G, DE PLACIDO G, NIKAS Y, ALVIGGI C. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends in molecular medicine* 2003;9:223-8.
14. ESKENAZI B, WARNER ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 1997;24:235-58.
15. BALASCH J, CREUS M, FABREGUES F, et al. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Human reproduction* 1996;11:387-91.
16. MEULEMAN C, VANDENABEELE B, FIEUWS S, SPIESSENS C, TIMMERMAN D, D'HOOGHE T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertility and sterility* 2009;92:68-74.
17. ADAMSON GD, PASTA DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertility and sterility* 2010;94:1609-15.

18. KENNEDY S, BERGQVIST A, CHAPRON C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Human reproduction* 2005;20:2698-704.
19. WYKES CB, CLARK TJ, KHAN KS. Accuracy of laparoscopy in the diagnosis of endometriosis: a systematic quantitative review. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2004;111:1204-12.
20. MEDICINE ASFR. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *FERTILITY AND STERILITY* 1997;67:817-20.
21. GARCÍA MANERO M, OLARTECOECHEA B, ROYO MANERO P, AUBÁ M, LÓPEZ G. [Endometriosis]. *Rev Med Univ Navarra* 2009;53:4-7.
22. NOVELLAS S, FOURNOL M, CARAMELLA T, et al. [MR imaging evaluation of endometrial carcinoma]. *J Radiol* 2008;89:1711-20.
23. BAZOT M, GASNER A, LAFONT C, BALLESTER M, DARAI E. Deep pelvic endometriosis: Limited additional diagnostic value of postcontrast in comparison with conventional MR images. *Eur J Radiol* 2011.
24. NNOAHAM KE, HUMMELSHOJ L, WEBSTER P, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertility and sterility* 2011;96:366-73 e8.
25. SIMOENS S, DUNSELMAN G, DIRKSEN C, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Human reproduction* 2012;27:1292-9.
26. PARAZZINI F, BERTULESSI C, PASINI A, et al. Determinants of short term recurrence rate of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2005;121:216-9.
27. NACUL AP, LECKE SB, EDELWEISS MI, MORSCH DM, SPRITZER PM. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. *Obstetrics and gynecology international* 2013;2013:879618.
28. YOSHINO O, IZUMI G, SHI J, et al. Activin-A is induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma. *Fertility and sterility* 2011;96:118-21.
29. SALMASSI A, ACIL Y, SCHMUTZLER AG, KOCH K, JONAT W, METTLER L. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertility and sterility* 2008;89:1578-84.
30. BULUN SE. Endometriosis. *The New England journal of medicine* 2009;360:268-79.
31. CARMONA F, CHAPRON C, MARTINEZ-ZAMORA MA, et al. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. *Journal of reproductive immunology* 2012;95:80-6.
32. CONNEELY OM, LYDON JP. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 2000;65:571-7.
33. DAVIES S, DAI D, WOLF DM, LESLIE KK. Immunomodulatory and transcriptional effects of progesterone through progesterone A and B receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2004;11:494-9.

34. DANDONA P, CHAUDHURI A, GHANIM H, MOHANTY P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2007;99:15B-26B.
35. FESTA A, D'AGOSTINO R, HOWARD G, MYKKÄNEN L, TRACY RP, HAFFNER SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102:42-7.
36. WU JT, WU LL. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clin Chim Acta* 2006;366:74-80.
37. VITTIMBERGA FJ, FOLEY DP, MEYERS WC, CALLERY MP. Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg* 1998;227:326-34.
38. BAIGRIE RJ, LAMONT PM, KWIATKOWSKI D, DALLMAN MJ, MORRIS PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992;79:757-60.
39. RONGIONE AJ, KUSSKE AM, KWAN K, ASHLEY SW, REBER HA, MCFADDEN DW. Interleukin-10 protects against lethality of intra-abdominal infection and sepsis. *J Gastrointest Surg* 2000;4:70-6.
40. BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
41. FRANCISCO G, HERNÁNDEZ C, SIMÓ R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. *Clin Chim Acta* 2006;369:1-16.
42. YUDKIN JS, STEHOUWER CD, EMEIS JJ, COPPACK SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
43. WILLERSON JT, RIDKER PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 2004;109:II2-10.
44. RAUCHHAUS M, DOEHNER W, FRANCIS DP, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102:3060-7.
45. GIRALDO E, HINCHADO MD, GARCIA JJ, ORTEGA E. Influence of gender and oral contraceptives intake on innate and inflammatory response. Role of neuroendocrine factors. *Mol Cell Biochem* 2008;313:147-53.
46. KAMIMURA D, ISHIHARA K, HIRANO T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:1-38.
47. O'GARRA A, VIEIRA P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007;7:425-8.
48. KARALIS KP, GIANNOGONAS P, KODELA E, KOUTMANI Y, ZOUMAKIS M, TELI T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J* 2009;276:5747-54.
49. MENGER MD, VOLLMAR B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg* 2004;389:475-84.
50. SURREY ES, HALME J. Effect of peritoneal fluid from endometriosis patients on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Obstetrics and gynecology* 1990;76:792-7.
51. BAUER J, BAUER TM, KALB T, et al. Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages.

- Comparison with the expression in human hepatocytes. *The Journal of experimental medicine* 1989;170:1537-49.
52. HALME J. Release of tumor necrosis factor-alpha by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro. *American journal of obstetrics and gynecology* 1989;161:1718-25.
  53. VELASCO I, ACIEN P, CAMPOS A, ACIEN MI, RUIZ-MACIA E. Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *Journal of reproductive immunology* 2010;84:199-205.
  54. D'HOOGHE TM, XIAO L, HILL JA. Cytokine profiles in autologous peritoneal fluid and peripheral blood of women with deep and superficial endometriosis. *Archives of gynecology and obstetrics* 2001;265:40-4.
  55. BERKKANOGLU M, ARICI A. Immunology and endometriosis. *American journal of reproductive immunology* 2003;50:48-59.
  56. ARICI A, MATALLIOTAKIS I, GOUMENOU A, et al. Increased levels of interleukin-15 in the peritoneal fluid of women with endometriosis: inverse correlation with stage and depth of invasion. *Human reproduction* 2003;18:429-32.
  57. SIRISTATIDIS C, NISSOTAKIS C, CHRELIAS C, IACOVIDOU H, SALAMALEKIS E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2006;32:162-70.
  58. OTHMAN EE, ZHU ZB, CURIEL DT, et al. Toward gene therapy of endometriosis: transductional and transcriptional targeting of adenoviral vectors to endometriosis cells. *American journal of obstetrics and gynecology* 2008;199:117 e1-6.
  59. BEDAIWY MA, FALCONE T. Laboratory testing for endometriosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004;340:41-56.
  60. AGIC A, XU H, FINAS D, BANZ C, DIEDRICH K, HORNUNG D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecologic and obstetric investigation* 2006;62:139-47.
  61. ODUKOYA OA, AJJAN R, LIM K, WATSON PF, WEETMAN AP, COOKE ID. The pattern of cytokine mRNA expression in ovarian endometriomata. *Molecular human reproduction* 1997;3:393-7.
  62. BEDAIWY MA, FALCONE T, SHARMA RK, et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Human reproduction* 2002;17:426-31.
  63. LUCIDI RS, WITZ CA, CHRISCO M, BINKLEY PA, SHAIN SA, SCHENKEN RS. A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. *Fertility and sterility* 2005;84:16-21.
  64. SHINOHARA A, KUTSUKAKE M, TAKAHASHI M, KYO S, TACHIKAWA E, TAMURA K. Protease-activated receptor-stimulated interleukin-6 expression in endometriosis-like lesions in an experimental mouse model of endometriosis. *Journal of pharmacological sciences* 2012;119:40-51.
  65. GAZVANI MR, CHRISTMAS S, QUENBY S, KIRWAN J, JOHNSON PM, KINGSLAND CR. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease. *Human reproduction* 1998;13:1957-61.

66. PELLICER A, ALBERT C, MERCADER A, BONILLA-MUSOLES F, REMOHI J, SIMON C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertility and sterility* 1998;70:425-31.
67. MARTINEZ S, GARRIDO N, COPERIAS JL, et al. Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Human reproduction* 2007;22:836-42.
68. SOMIGLIANA E, INFANTINO M, CANDIANI M, et al. Association rate between deep peritoneal endometriosis and other forms of the disease: pathogenetic implications. *Human reproduction* 2004;19:168-71.
69. FAIRBANKS F, ABRAO MS, PODGAEC S, DIAS JA, JR., DE OLIVEIRA RM, RIZZO LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertility and sterility* 2009;91:320-4.
70. HASSA H, TANIR HM, TEKIN B, KIRILMAZ SD, SAHIN MUTLU F. Cytokine and immune cell levels in peritoneal fluid and peripheral blood of women with early- and late-staged endometriosis. *Archives of gynecology and obstetrics* 2009;279:891-5.
71. GYNAECOLOGISTS SACOTRCoOA. Multiple pregnancy following assisted reproduction. *Hum Fertil (Camb)* 2011;14:3-7.
72. GYNECOLOGISTS ACoOA, CANADA SoOAGO, GYNECOLOGY CAFOAASOOA, et al. Joint policy statement: Cervical cancer prevention in low-resource settings. *J Obstet Gynaecol Can* 2004;26:205-8.
73. NOYES R, HETING A, ROCK J. Dating the endometrial biopsy. *Fertility and Sterility* 1950;1:3-25.
74. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
75. HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
76. **APPLIEDBIOSYSTEMS.COM**. Relative quantitation of gene expression experimental design and analysis: relative standard curve method and comparative Ct method(**ΔΔ**, 2004).
77. Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System Getting Started Guides: Applied Biosystems by Lyfe Thecnologies.

#### 4. ARTIGO ORIGINAL

### **Circulating and peritoneal fluid Interleukin-6 levels and gene expression in pelvic endometriosis**

**Short Title:** IL-6 levels and gene expression in endometriosis

Vânia T. Andrade<sup>1</sup>; Andrea P. Nácul<sup>2</sup>; Betânia R. Santos<sup>1</sup>; Sheila B. Lecke<sup>1,3</sup>;  
Poli Mara Spritzer<sup>1,4</sup>, Débora M. Morsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90035-003, Brazil

<sup>2</sup>Human Reproduction Unit, Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, 90430-001, Brazil

<sup>3</sup>Department of Diagnostic Methods, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 90050-170, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-003, Brazil.

This study was carried out at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

#### **Corresponding author**

Débora Martinho Morsch, MD, PhD

Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil



Tel/Fax: +55 51-3359-8027

E-mail: [dmmorsch@yahoo.com.br](mailto:dmmorsch@yahoo.com.br)

## **ABSTRACT**

**Background/Aims:** Current data are controversial regarding the association between interleukin-6 (IL-6), a marker of acute phase inflammation, and pelvic endometriosis. The aim of this study was to assess IL-6 levels in serum and peritoneal fluid (PF), and IL-6 gene expression in adipose tissue and endometrial samples in pelvic endometriosis.

**Methods:** Thirty patients with endometriosis and 18 women with a normal pelvis were enrolled in this case-control study. PF and serum IL-6 levels were determined using a human enzyme-linked immunosorbent assay and IL-6 gene expression was performed by real time RT-PCR .

**Results:** PF IL-6 levels were higher in endometriosis than in normal pelvis group ( $p= 0.047$ ) and patients with endometriosis stage III/IV presented higher PF IL-6 levels than those with endometriosis stage I/II and control group ( $p<0.001$ ). There was a strong correlation between PF IL-6 levels and the r-ASRM score for endometriosis severity ( $r=0.77$ ;  $p<0.001$ ). IL-6 gene expression did not differ significantly between endometriosis and control groups in endometrial samples or in adipose tissue of both groups.

**Conclusion:** Our findings suggest that IL-6 may be associated with the presence and severity of pelvic endometriosis. The source of this higher IL-6 seems not to be specifically related to regional adipose tissue.

**Key words:** adipose tissue; endometriosis; gene expression; interleukin-6; peritoneal fluid.

## **INTRODUCTION**

Endometriosis is a chronic inflammatory condition characterized by implantation and growth of endometrial tissue outside the uterine cavity, which seems to depend on an abnormal peritoneal microenvironment with increased levels of pro-inflammatory cytokines and growth factors. Interleukin-6 (IL-6) is a glycoprotein secreted by several cell types, such as peritoneal macrophages, endometrial stromal cells and adipose tissue (AT) [1]. AT is an abundant supply of inflammatory cytokines and contributes with approximately 35% of circulating IL-6 [2,3].

IL-6 is a marker of acute phase inflammation and has several biological activities, such as induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression [4], growth and differentiation of B lymphocytes and activation of T lymphocytes [5]. IL-6 also has important functions in reproductive physiology, as it regulates ovarian steroid production, folliculogenesis and early events associated with implantation [6]. Some studies found elevated IL-6 concentrations in peritoneal fluid (PF) of patients with endometriosis in comparison with controls without the disease [7-9], whereas others failed to show this difference [10,11].

Studies have reported different serum markers that could detect patients in the initial stages of endometriosis, when ablation or excision of lesions improves reproductive outcomes [11-18]. Among these markers, IL-6 seems to present good discriminatory power [11,14,17]. In turn, others have

demonstrated that combined analyses of different serum markers might improve the accuracy of endometriosis diagnosis [12,13,15,16,18], but results revealed that no highly accurate marker for endometriosis has been defined. Therefore, the aims of the present study were to determine IL-6 levels in serum and peritoneal fluid, as well as IL-6 gene expression in subcutaneous and visceral fat and in eutopic and ectopic endometrium of patients with pelvic endometriosis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Patients***

This study enrolled women who underwent gynecological laparoscopy in the Human Reproductive Unit of Hospital Fêmima and had a diagnosis of endometriosis confirmed during the procedure. Endometriosis was diagnosed if atypical implants were seen during laparoscopy or confirmed by histological examination of sites with signs suggestive of active endometriosis. Women without evidence of pelvic disease according to laparoscopic and histopathological examinations were included in the control group (normal pelvis). Infertility was defined as absence of pregnancy after one year of sexual intercourse without contraception. Chronic pelvic pain was defined as non-cyclical pelvic pain during at least six months and severe enough to cause limitations or request medical treatment. Thirty women with endometriosis and 18 women with a normal pelvis were included in the study. The inclusion criteria were: (1) pre-menopausal women (range 21-50 yr) and (2) had not received hormones for at least 3 months before surgery. The exclusion criterium was body mass index (BMI) above 35. The study protocol was approved by the local

Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all participants.

### ***Study protocol***

All the women underwent clinical examination. All laparoscopies were performed by the same surgeon (APN), who diagnosed and staged endometriosis, according to the revised American Society for Reproductive Medicine classification [19].

Procedures were scheduled preferably for the secretory phase of the cycle, but some patients were included in the proliferative phase (22.4%). Dates of menstrual cycle were confirmed by histological examination and defined according to the criteria described by Noyes et al.[20]. In two patients the endometrial biopsies were unsatisfactory, and one patient had a hysterectomy before the study was completed.

Peripheral venous blood samples were collected immediately before laparoscopy, and peritoneal fluid (PF), immediately after the beginning of the procedure. Samples were refrigerated until processing in the laboratory. Cell components from blood and PF were removed by centrifugation at 300 g for 20 minutes. The supernatant were collected and stored in aliquots at -80 °C until assayed.

### ***Serum hormone measurements***

Serum estradiol and progesterone were assayed by electrochemiluminescence (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Intra and interassay coefficients of variation (CVs) were below 5%.

### ***Serum and peritoneal fluid IL-6 measurements***

IL-6 levels were determined using a human enzyme-linked immunosorbent assay with a detection limit of 3.10 pg/mL (Assay Designs, Inc, Michigan, USA) and intra and interassay CVs of 5.3% and 12.4%, respectively. Analyses were performed in duplicate accordingly to the manufacturer instructions and the use of two quality control samples.

### ***Tissue collection***

Eutopic and ectopic endometrial samples as well as subcutaneous and visceral adipose tissue samples were collected from the pelvis region before the end of the video laparoscopy procedure. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until total RNA isolation.

### ***Gene expression***

*RNA Isolation.* Total RNA samples extraction was carried out in phenol/guanidine isothiocyanate (Trizol, Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA), as previously described [21]. Concentration and quality of total RNA were assessed using a Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

*Reverse Transcription (RT) and Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Protocols.* Reverse transcription of 1 µg of total RNA into cDNA was carried out using the Superscript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA), [21-23]. Real-time PCR was performed in triplicate, using the ViiA-7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and heated for 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C). Experiments were performed by monitoring in real time the increase in fluorescence of the SYBR Green dye, as previously described [24-26]. Primers

were designed by Primer Express 3.0 Software for Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and acquired from Invitrogen (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Forward and reverse primer sequences designed for IL-6 (NM\_000600) were (5' to 3') CCACACAGACAGCCACTCA and CATCCATCTTTTTTCAGCCATCT, respectively. GAPDH gene (NM\_001256799) was used to normalize mRNA quantitation with forward and reverse sequences respectively ACCCACTCCTCCACCTTTG and CTCTTGTGCTCTTGCTGGG (5' to 3'). cDNA samples (1.0 ng/ $\mu$ L) were mixed with a predetermined forward and reverse primer volume (respectively, 1.0 and 1.0  $\mu$ L for IL-6, 0.5 and 0.5  $\mu$ L for GAPDH) and 5.0  $\mu$ L of Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a total of 10.0  $\mu$ L. Protocol conditions consisted of denaturation at 95 °C for 20 s, followed by 50 cycles (5 s at 95 °C and 20 s at 60 °C). Primers generated amplicons that produced a single sharp peak during melting curve analysis. Data were analyzed by relative quantitation using the comparative  $C_T$  method [28].

### ***Statistical analysis***

Results were presented as mean  $\pm$  SD or median and interquartile range (25%-75%). Comparisons between means were analyzed by the unpaired two-tailed Student's t-test or Mann-Whitney U test. The Chi-Square test was used to compare qualitative variables. Pearson's or Spearman's rank correlation coefficients were calculated between variables using a two-tailed test for significance. Log<sub>10</sub> transformation was used to normalize the distribution of non-Gaussian variables, and mean values were back-transformed for presentation. Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The

Statistical Package for the Social Sciences 18 (SPSS, Chicago, IL) was used in the analysis.

## **RESULTS**

Patients with endometriosis patients and women with normal pelvis presented similar age ( $32.6 \pm 7.4$  vs.  $33 \pm 5.8$  years old,  $p= 0.98$ ) and BMI ( $25.5 \pm 4.5$  vs.  $25.2 \pm 3.5$  kg/m<sup>2</sup>,  $p=0.86$ ). Table I shows the similarities between patients with endometriosis and women with normal pelvis according to serum estradiol, progesterone levels and phase of menstrual cycle ( $p>0.05$ ).

Endometriosis was classified as minimal (stage I) in 13 patients, moderate (stage III) in 7 patients and severe (stage IV) in 10 patients. Active endometriosis, characterized by red lesions, was predominant in sixteen (53,3%) patients; black and white lesions were found in ten (33,3%) patients; and endometrioma as the main finding of laparoscopy was seen in four (13,3%) patients. In the endometriosis group, laparoscopy was performed for infertility in 11 (36.7%), pelvic pain in 10 (33.3%), adnexal pathology in 7 (23.3%) and tubal ligation in 2 (6.6%). In the control group, laparoscopy was performed for tubal ligation in 13 (72.2%), infertility in 4 (22.2%) and for both tubal ligation and pelvic pain in 1 (5.6%).

### ***IL-6 in serum and peritoneal fluid***

IL-6 levels were detected in peritoneal fluid of all patients for whom this cytokine was measured (25 patients with endometriosis and 16 control women). PF IL-6 levels were significantly higher in the endometriosis than in the control group (Figure 1A). In addition, PF IL-6 concentrations were significantly higher in patients with endometriosis stage III/IV than in patients with endometriosis

stage I/II and in the control group (Figure 1B). However, there were no significant differences in PF IL-6 levels between patients with endometriosis stage I/II and the control group. Figure 2 shows a strong correlation between IL-6 levels in PF and the revised American Society for Reproductive Medicine classification (r-ASRM) [19] scores of endometriosis severity ( $r= 0.77$ ;  $p=0.001$ ). Regarding IL-6 serum levels, most of the samples presented results below the limit of detection of the assay. Only eleven patients, eight in the endometriosis group [10.2 (8.5-12.6 pg/mL)] and three in the control group [9.5 (7.9-12.4 pg/mL)] ( $p=0.77$ ) showed IL-6 concentrations greater than 3.10 pg/mL.

### ***IL-6 gene expression in eutopic and ectopic endometrium and in subcutaneous and visceral adipose tissue***

Gene expression of IL-6 did not differ significantly between patients and controls in subcutaneous or in visceral adipose tissue (Figure 3A). Gene expression of IL-6 was also similar in eutopic and ectopic endometrial tissue of patients with endometriosis, as well as in the endometrium of women with normal pelvis (Figure 3B).

## **DISCUSSION**

In the present study we found an increase in PF IL-6 levels of patients with endometriosis in comparison with women with normal pelvis. In addition, patients with moderate and severe disease had significant higher levels of PF IL-6 than patients with minimal and mild endometriosis and control women. Moreover, a strong positive correlation was observed between PF IL-6 and endometriosis severity.



Current available data on literature are controversial regarding the association between IL6 and pelvic endometriosis. Indeed, our results agree in part with the findings reported by Velasco et al (2010), who described increased PF IL-6 levels in patients with moderate or severe endometriosis, but no correlation of IL-6 with endometriosis severity [9]. This might be explained by the fact that only patients with more advanced stages of the disease were included in their study. Punnonen et al. (1996) also reported increased levels of IL-6 and IL-10 in PF of patients with endometriosis, although also without any correlation with disease severity [7]. Khan et al (2002) did not find any differences in IL-6 in PF of patients with endometriosis and in controls without the disease [10]. In that study, laparoscopy revealed that patients with red lesions had higher levels of IL-6, hepatocyte growth factor (HGF), estradiol and progesterone than patients with black and white lesions or controls [10]. It is widely believed that atypical lesions (red) are more biologically active than typical ones (black) [29]. Patients with early stages of endometriosis but with more active lesions might have an increased level of cytokine secretion that could explain the symptoms of pain and infertility. Indeed, active endometriosis lesions, rather than the lesion extension, seem to be a more accurate parameter of disease severity. In a previous study, Harada et al. (1997) correlated PF IL-6 levels, its soluble receptor and the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) with the number and size of endometrial implants in infertile patients [8]. In addition to increased levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with endometriosis, they found a positive correlation between red lesions and cytokine levels. They suggested that increased levels of cytokines in PF might be associated with infertility and the pathogenesis of endometriosis. Also, the

production of IL-6 might be the result of stimulation by increased levels of TNF- $\alpha$  [8]. In this sense, endometriosis samples in the present study were characterized by active peritoneal and ovarian lesions in 70% of patients. This may be, at least in part, the reason why we found a positive and significant correlation of PF IL-6 levels and severity of the disease.

While one study reported levels of IL-6 in PF obtained in the secretory phase of the cycle [8], other authors did not find significant differences in PF or serum cytokine levels between proliferative or secretory phases [10,17]. In our study, laparoscopies were scheduled preferentially for the secretory phase to evaluate the association between IL-6 and endometrial differentiation, rather than proliferation. However, the material from some participants was collected in the proliferative phase, and serum and PF IL-6 levels could be compared in the two phases for both patients with endometriosis and control participants. Our findings suggest that IL-6 production is not modulated by steroid hormone fluctuations during the menstrual cycle.

According to some studies, different cut-off values for serum levels of IL-6 seem to be good predictors of endometriosis [14,17,30]. Others have suggested that an association of serum markers might increase diagnostic accuracy [13,18]. Our study findings are in agreement with those reported by Kalu et al (2007), who did not find any differences in serum IL-6 of patients with endometriosis in comparison with patients without endometriosis [31]. One limitation of our study was that the levels of IL-6 were detectable in the samples of some but not all patients because of the test detection limit. Variations in assay methods, patient selection, or both may also have accounted for differences in our results.

In the present study, the association between IL-6 levels and its gene expression in endometrial tissue was also investigated. No differences were found in IL-6 gene expression either in eutopic or ectopic endometrium of patients with endometriosis compared to women with normal pelvis. Another study have shown that the expression of IL-6 on endometriosis can be increased in ectopic tissue [32]. Tsudo et al. (2000) also detected a significant increase of IL-6 expression in endometriotic tissue, derived from stromal cells. These differences between the studies may be due, at least in part, to the types of lesions being assessed, such as peritoneal, ovarian or deeply infiltrating endometriosis in each study. Moreover, some evidence indicates that these lesions may be considered separate entities with different pathogenesis [33,34]. Therefore, further studies are needed to additionally assess IL-6 protein expression on endometrium because an altered post-transcriptional control system may be operative in this circumstance.

In addition, we found no differences in IL-6 gene expression either in visceral or subcutaneous AT of patients with endometriosis compared to women with normal pelvis. This means that the source of higher IL-6 levels on PF of patients with endometriosis seems not to be related to regional AT. Other cells such as peritoneal macrophages and leukocytes could be evolved with IL-6 as previously reported [33] and merit additional studies.

In conclusion, present results suggest that IL-6 may be associated with the presence and severity of endometriosis. Further studies should evaluate IL-6 protein expression in eutopic and ectopic endometrium in order to elucidate the role of this cytokine in the pathogenesis of endometriosis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Brazilian National Institute of Hormones and Women's Health, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq INCT 573747/2008-3] and Fundo de Apoio à Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre [FIPE-HCPA 07-339], Brazil.

## REFERENCES

- 1 Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-355.
- 2 Proença AR, Sertié RA, Oliveira AC, Campaña AB, Caminhoto RO, Chimin P, Lima FB: New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 2014;47:192-205.
- 3 Burney RO, Giudice LC: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2012;98:511-519.
- 4 Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E: Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:3092-3096.
- 5 Nothnick WB: Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertility and sterility* 2001;76:223-231.
- 6 Akoum A, Lemay A, Paradis I, Rheault N, Maheux R: Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids. *Human reproduction (Oxford, England)* 1996;11:2269-2275.
- 7 Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R: Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1996;174:1522-1526.
- 8 Harada T, Yoshioka H, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, Terakawa N: Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1997;176:593-597.
- 9 Velasco I, Acien P, Campos A, Acien MI, Ruiz-Macia E: Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *Journal of reproductive immunology*;84:199-205.
- 10 Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Hamasaki T, Kitajima M, Hasuo A, Miyamura Y, Ishimaru T: Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 2002;81:764-771.
- 11 Bedaiwy MA, El-Nashar SA, Sharma RK, Falcone T: Effect of ovarian involvement on peritoneal fluid cytokine concentrations in endometriosis patients. *Reproductive biomedicine online* 2007;14:620-625.

- 12 Gagne D, Rivard M, Page M, Lepine M, Platon C, Shazand K, Hugo P, Gosselin D: Development of a nonsurgical diagnostic tool for endometriosis based on the detection of endometrial leukocyte subsets and serum ca-125 levels. *Fertility and sterility* 2003;80:876-885.
- 13 Somigliana E, Vigano P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, Di Blasio AM: Use of the concomitant serum dosage of ca 125, ca 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Human reproduction (Oxford, England)* 2004;19:1871-1876.
- 14 Martinez S, Garrido N, Coperias JL, Pardo F, Desco J, Garcia-Velasco JA, Simon C, Pellicer A: Serum interleukin-6 levels are elevated in women with minimal-mild endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)* 2007;22:836-842.
- 15 Agic A, Djalali S, Wolfler MM, Halis G, Diedrich K, Hornung D: Combination of ccr1 mRNA, mcp1, and ca125 measurements in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 2008;15:906-911.
- 16 Seeber B, Sammel MD, Fan X, Gerton GL, Shaunik A, Chittams J, Barnhart KT: Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients. *Fertility and sterility* 2008;89:1073-1081.
- 17 Othman Eel D, Hornung D, Salem HT, Khalifa EA, El-Metwally TH, Al-Hendy A: Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2008;137:240-246.
- 18 Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, Simsa P, Pochet N, De Smet F, De Moor B, Meuleman C, Billen J, Blanckaert N, Vodolazkaia A, Fulop V, D'Hooghe TM: Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Human reproduction (Oxford, England)*;25:654-664.
- 19 Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility* 1997;67:817-821.
- 20 Noyes R, Heting A, Rock J: Dating the endometrial biopsy. *Fertility and Sterility* 1950;1:3-25.
- 21 Nácúl AP, Lecke SB, Edelweiss MI, Morsch DM, Spritzer PM: Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: A case-control study. *Obstet Gynecol Int* 2013;2013:879618.
- 22 Lecke SB, Mattei F, Morsch DM, Spritzer PM: Abdominal subcutaneous fat gene expression and circulating levels of leptin and adiponectin in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:2044-2049.
- 23 Lecke SB, Morsch D, Spritzer PM: Circulating levels and subcutaneous adipose tissue gene expression of pigment epithelium-derived factor in polycystic ovary syndrome and normal women: A case control study. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:77.
- 24 Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413-417.
- 25 Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-1030.

- 26 Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F: Investigations on dna intercalation and surface binding by sybr green i, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e103.
- 27 **appliedbiosystems.com**: relative quantitation of gene expression experimental design and analysis: Relative standard curve method and comparative ct method(55, 2004.
- 28 Applied biosystems® viia™ 7 real-time pcr system getting started guides, Applied Biosystems by Lyfe Thecnologies
- 29 Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T: Higher activity by opaque endometriotic lesions than nonopaque lesions. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2004;83:375-382.
- 30 Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, Agarwal A: Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: A prospective controlled trial. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002;17:426-431.
- 31 Kalu E, Sumar N, Giannopoulos T, Patel P, Croucher C, Sherriff E, Bansal A: Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2007;33:490-495.
- 32 Salmassi A, Acil Y, Schmutzler AG, Koch K, Jonat W, Mettler L: Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril* 2008;89:1578-1584.
- 33 Tsudo T, Harada T, Iwabe T, Tanikawa M, Nagano Y, Ito M, Taniguchi F, Terakawa N: Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertility and sterility* 2000;73:205-211.
- 34 Nisolle M, Donnez J: Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68:585-596.

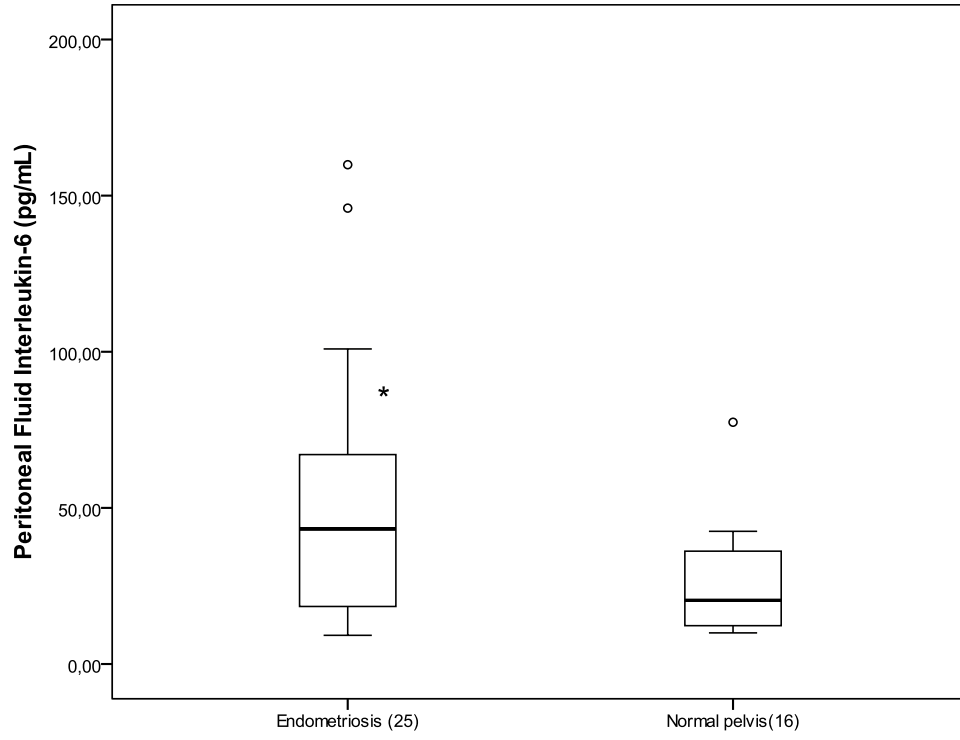
## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1:** Peritoneal fluid IL-6 concentrations (A) in patients with endometriosis (n=25) and women with normal pelvis (control group, n=16), \*p= 0.047, Mann-Whitney U; and (B) stratified according to stages of endometriosis using the revised American Society for Reproductive Medicine classification [19], \*p<0.001 in relation to minimal/mild and normal pelvis groups (Mann-Whitney U).

**Figure 2:** Association between peritoneal fluid IL-6 and r-ASRM scores in patients with endometriosis (r=0.77; p<0.001).

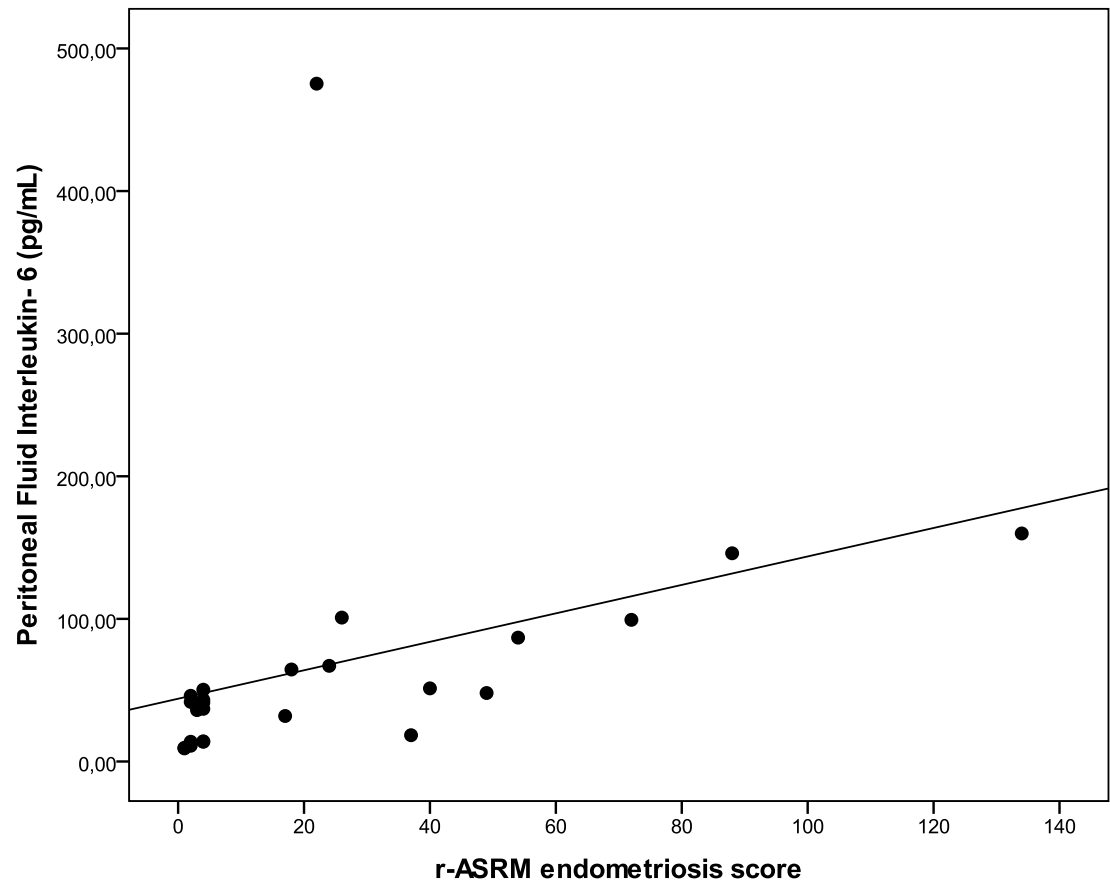
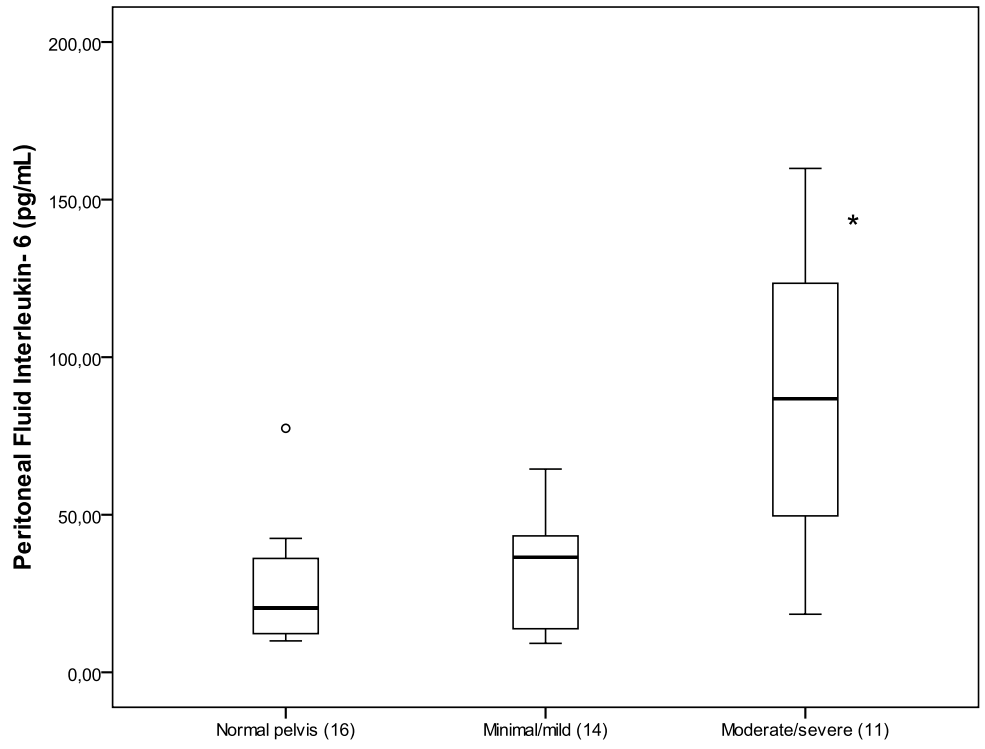
**Figure 3:** IL-6 gene expression (A) in subcutaneous and visceral adipose tissue (AT); and (B) in endometrial tissue, of patients with endometriosis and normal pelvis (control group). Messenger RNA (mRNA) was expressed as n fold change differences from the calibrator sample ( $\Delta\Delta C_T$  method). The number of biopsies analyzed per group appears within parentheses. Values are expressed as median and interquartile range (25%–75%). \*p>0.05 by log10 transformation and two-tailed Student's t-test.

**A**

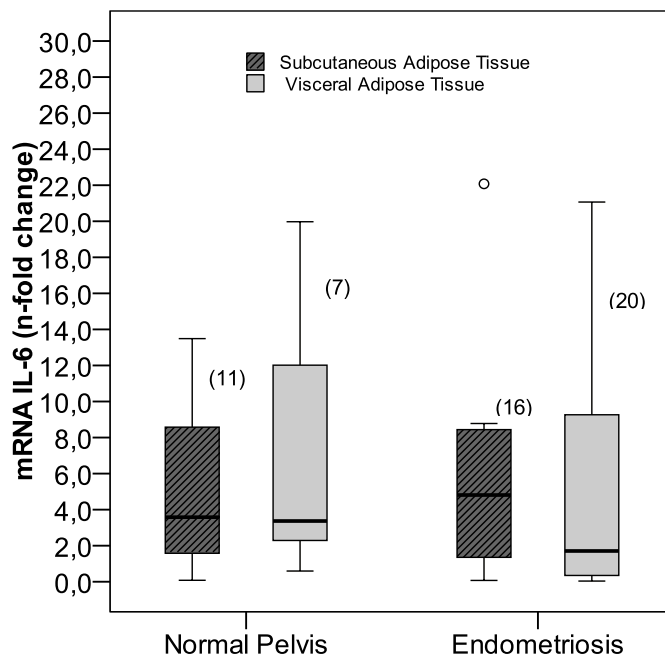


**B**

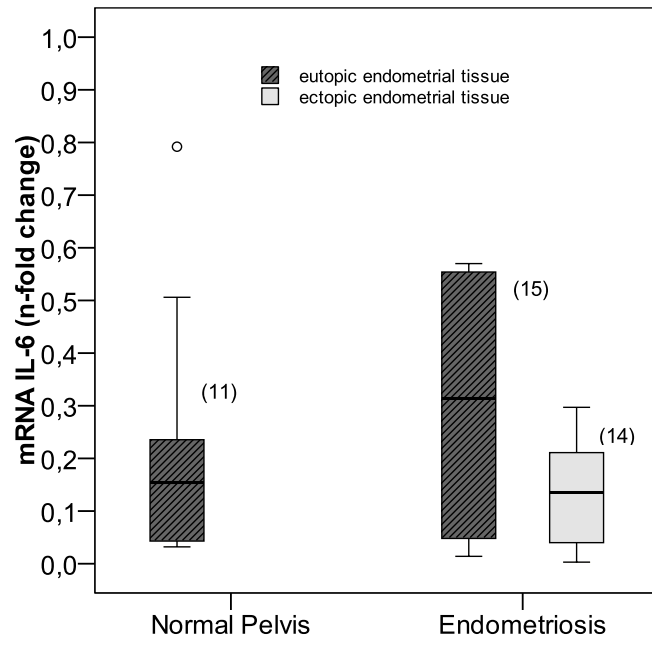




**A**



**B**



**Table 1:** Distribution of patients with endometriosis and patients with a normal pelvis (control group) according to serum estradiol and progesterone levels and phase of menstrual cycle. \*: Kruskal-Wallis, <sup>b</sup>: Data presented as median and interquartile range.

	Endometriosis		Controls	p*
	Stage I/II	Stage III/IV		
	n=13	n=17	n=18	
<b>Phase of cycle n (%)</b>				
Proliferative	3 (23.1)	3 (18.8)	4 (22.2)	
Secretory	10 (76.9)	13 (81.2)	12 (66.7)	
<b>Estradiol (pg/mL)<sup>b</sup></b>				
Proliferative	122 (11-164)	157 (63-169)	65 (18-144)	0.55
Secretory	143 (65-231)	102 (42-214)	91 (55-132)	0.64
<b>Progesterone (ng/mL)<sup>b</sup></b>				
Proliferative	0.20 (0.16-0.79)	0.73 (0.20-0.80)	0.42 (0.21-0.86)	0.71
Secretory	6.12 (0.92-13.22)	1.05 (0.37-9.50)	4.15 (0.59-9.16)	0.44