



JOÃO AGRIPINO GUIMARÃES

**ANÁLISE DA POLARIZAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA TH1 E TH2 EM MULHERES
COM INFERTILIDADE INEXPLICADA E
MULHERES INFÉRTEIS COM
ENDOMETRIOSE**

**CAMPINAS
2012**



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOÃO AGRIPINO GUIMARÃES

**ANÁLISE DA POLARIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA
TH1 E TH2 EM MULHERES COM INFERTILIDADE INEXPLICADA E
MULHERES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE**

Orientadora: Profa. Dra. Egle Cristina Couto de Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Tocoginecologia

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO JOÃO AGRIPINO GUIMARÃES
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G947a Guimarães, João Agripino, 1972-
Análise da polarização da resposta imunológica TH1
e TH2 em mulheres com infertilidade inexplicada e
mulheres inférteis com endometriose / João Agripino
Guimarães. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Egle Cristina Couto de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citocinas. 2. Endometriose. 3. Imunologia. 4.
Infertilidade. 5. Interleucinas. I. Carvalho, Egle Cristina
Couto de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Polarization of TH1 and TH2 immune response analysis in women with unexplained infertility and infertility with endometriosis.

Palavras-chave em inglês:

Cytokines
Endometriosis
Immunology
Infertility
Interleukins

Área de concentração: Saúde Materna e Perinatal

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Egle Cristina Couto de Carvalho [Orientador]
Sílvia Daher

Helaine Maria Bestetti Pires Milanez

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: JOÃO AGRIPINO GUIMARÃES

Orientadora: Profa. Dra. EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO

Membros:

1. Profa. Dra. Egle Cristina Couto de Carvalho



2. Profa. Dra. Sílvia Daher



3. Profa. Dra. Helaine Maria Bestetti Pires Milanez



**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 30/11/2012

201300313

Dedico este trabalho...

Aos meus filhos Gabriela Maria e Samuel por terem caminhado sempre ao meu lado durante a realização desta tarefa, que exige muita doação pessoal e compreensão familiar.

Agradecimentos

A Deus, que confiou esta tarefa de pesquisa científica a mim, e que incentiva tantos outros pesquisadores a contribuírem para a evolução do conhecimento científico em favor da comunidade.

A minha família, em especial à minha avó Lourdes, minha mãe Vanda e ao meu tio João pelo incentivo desde o início, no jardim de infância, e à minha mulher Lucielaine, que na finalização desta tarefa me proporcionou apoio singular em relação à sustentação da solidez da estrutura familiar.

A minha orientadora, Egle Cristina Couto de Carvalho, que com muita paciência e sabedoria incentivou a conclusão deste estudo.

A todos os professores da pós-graduação.

Aos professores Helaine Maria Besteti Pires Mayer Milanez, José Guilherme Cecatti, José Roberto E Gabiatti, Lúcia Helena Simões Costa Paiva, Marcelo Luis Nomura, Sophie F M Derchain e Sofia Rocha Lieber, que contribuíram para a concretização deste estudo.

Aos funcionários dos ambulatórios de obstetrícia, do Cemicamp, e do Hemocentro.

A Fundação de Amparo à Pesquisa- FAPESP.

Resumo

Contexto e objetivo: Alterações imunológicas podem estar associadas à infertilidade e endometriose. O objetivo deste estudo foi avaliar se, na infertilidade inexplicada e na infertilidade associada à endometriose, ocorre polarização da resposta imunológica Th1 ou Th2. **Tipo de estudo e local:** Foi realizado um estudo de corte transversal no Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM), Universidade de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brasil, de janeiro a junho de 2010. **Métodos:** 142 mulheres foram alocadas em três grupos (52 com infertilidade inexplicada, 38 inférteis com endometriose e 52 férteis) para dosagem de citocinas Th1 (interleucina 2, fator de necrose tumoral- α e do interferon- γ) e citocinas Th2 (interleucinas 4 e 10). Os dados foram descritos através de média, desvio-padrão e mediana, e através de frequências absolutas e relativas. Os grupos foram comparados em relação às variáveis através dos testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. As citocinas foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis; em caso de diferença significativa, foram feitas comparações dois a dois através do teste de Mann-Whitney e aceitou-se nível de significância 5%. **Resultados:** As mulheres com infertilidade inexplicada apresentaram menores níveis de interferon- γ ($p = 0,0012$) e maiores níveis de interleucina-4 ($p < 0,0001$) do que as mulheres férteis, e maiores níveis de interferon- γ ($p = 0,0001$) e de interleucina-4 ($p = 0,0005$) do que as mulheres inférteis com endometriose. Aquelas com infertilidade primária apresentaram menores níveis de interferon- γ e maiores de interleucina-4 que as mulheres férteis. **Conclusão:** Não foi detectado qualquer tipo de polarização da resposta imunológica Th1 ou Th2 nas mulheres

com infertilidade inexplicada ou com endometriose, quando comparadas com mulheres férteis.

Palavras-chave: citocinas, endometriose, imunologia, infertilidade, interleucinas.

Abstract

Context and objective: Immunological alterations may be associated with infertility and endometriosis. The aim of this study was to evaluate the polarization of Th1 and Th2 immune response in women with unexplained infertility and infertility associated with endometriosis. **Design and setting:** A cross-sectional study was performed at the Center for Integral Attention to Women's Health (CAISM) from University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil, from January to June 2010. **Methods:** 142 women were allocated into three groups (52 with unexplained infertility, 38 infertile women with endometriosis and 52 fertile women) for measurement of Th1 (interleukin 2, tumor necrosis factor- α and interferon- γ) and Th2 cytokines (interleukins 4 and 10). Data were reported as mean, standard deviation, median, and by absolute and relative frequencies. The groups were compared with respect to variables using the chi-square or Fisher exact test. Cytokines were compared between groups using the Kruskal-Wallis test and, if significant differences were noted, comparisons were made in pairs by Mann-Whitney test, with 5% significance level. **Results:** Women with unexplained infertility showed lower levels of interferon- γ ($p = 0.0012$) and increased levels of interleukin-4 ($p < 0.0001$) than fertile women, and higher levels of interferon- γ ($p = 0.0001$) and interleukin-4 ($p = 0.0005$) than infertile women with endometriosis. Those with primary infertility had lower levels of interferon- γ and interleukin-4 over than fertile women. **Conclusion:** We could not detect any polarization of Th1 or Th2 immune response in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis, when compared with fertile women.

Keywords: cytokines, endometriosis, immunology, infertility, interleukins.

Símbolos, siglas e abreviaturas

CAISM	Centro de Atenção integral á Saúde da Mulher – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti
Cemicamp	Centro de Pesquisa em Saúde Reprodutiva de Campinas
DTG	Departamento de Tocoginecologia
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
Hemocentro	Centro de Hematologia e Hemoterapia
ICSI	Injeção de espermatozói­de intracitoplasmática
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ml	Mililitros
pg	Picogramas
PE	Ficoeritrina-estreptavidina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	Fator transformador de crescimento
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Lista de Tabelas e Ilustrações

	página
Quadro 1	21
Tabela I	28
Tabela 1	49
Tabela 2	50
Tabela 3	51
Tabela 4	52
Tabela 5	53
Tabela 6	54
Figura 1	68

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xi
Lista de Tabelas e Ilustrações.....	xii
Sumário.....	xiii
1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Sujeitos e Método.....	21
3.1. Desenho do estudo.....	21
3.2. Tamanho amostral.....	21
3.3. Seleção dos sujeitos.....	22
3.3.1.a. Critérios de inclusão de mulheres inférteis com endometriose.....	22
3.3.1.b. Critérios de exclusão de mulheres inférteis com endometriose.....	22
3.3.2.a. Critérios de inclusão de mulheres com infertilidade inexplicada...	22
3.3.2.b. Critérios de exclusão de mulheres com infertilidade inexplicada..	23
3.3.3.a. Critérios de inclusão de mulheres férteis.....	23
3.3.3.b. Critérios de exclusão de mulheres férteis.....	23
3.4. Variáveis e conceitos.....	23

3.4.1. Variáveis independentes.....	23
3.4.2. Variáveis dependentes.....	24
3.4.3. Variáveis de controle.....	25
3.5. Técnicas, testes e exames.....	25
3.5.1. Dosagem das citocinas séricas.....	25
3.5.1.a Obtenção das amostras de soro.....	25
3.5.1.b Dosagem das citocinas nas amostras de soro.....	26
3.6. Instrumento para coleta de dados.....	27
3.7. Coleta de dados.....	27
3.8. Controle de qualidade.....	28
3.9. Processamento e análise dos dados.....	29
3.10. Aspectos éticos.....	29
4. Publicação.....	31
5. Conclusões.....	55
6. Referências Bibliográficas.....	56
7. Anexos.....	60
7.1. Anexo 1 - Carta de Aprovação da Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM.....	60
7.2. Anexo 2 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP.....	61
7.3. Anexo 3 - TCLE das mulheres inférteis com endometriose ou sem causa aparente.....	63
7.4. Anexo 4 - TCLE das mulheres férteis.....	65

7.5. Anexo 5 - Formulário para coleta de dados.....	67
7.6. Anexo 6 – Descrição do método para dosagem das citocinas segundo o manual do fabricante.....	68

1. Introdução

Citocinas são proteínas que participam da comunicação intercelular e estimulam a expressão de marcadores de superfície nos leucócitos do sistema imunológico para o reconhecimento de antígenos, patógenos e aloantígenos.

Tradicionalmente as citocinas que participam na ativação de macrófagos são do tipo Th1, citotóxicas, como a interleucina 2 (IL-2), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o interferon- γ (INF- γ). As que participam na geração de anticorpos são do tipo Th2, citoprotetoras, como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10).

Cada grupo de citocinas, Th1 ou Th2, estimula sua própria produção e inibe a produção das citocinas do outro grupo, desencadeando um efeito cruzado que pode polarizar a resposta imunológica (Abbas, 2008).

Esta polarização da resposta imunológica pode atuar de maneira favorável ou desfavorável na mediação do equilíbrio dinâmico do sistema reprodutor humano, desde a deposição do espermatozoide até o nascimento fetal, como na fase de implantação, em que a polarização para o grupo de citocinas Th2 favorece o desenvolvimento e crescimento do embrião (Bonetti, 2010).

Estudos evidenciam que modificações na produção de substâncias próprias do sistema imunológico podem acarretar alterações no processo reprodutivo que favorecerem a patogênese da infertilidade, com ou sem endometriose, que ainda hoje permanecem parcialmente conhecidas (Souza, 1997).

A implantação é um evento que depende de vários passos. A cada passo, há uma interação contínua entre o embrião e o útero e, conforme a janela de implantação foi descoberta e o conceito de receptividade uterina emergiu, a ideia de que as citocinas poderiam ter papel central neste processo tornou-se mais forte (Paulesu, 2010).

Durante a aposição e adesão, a indução de moléculas de adesão e ligantes adequados é um passo crítico. Há o envolvimento de citocinas e uma intensa ação hormonal (Singh, 2011). A interação entre o sistema imune e a unidade feto-placentária depende da distribuição de linfócitos T helper. As subpopulações de linfócitos mudam antes e durante a gestação, e o aumento de citocinas Th1 é visto no endométrio de mulheres não grávidas (Molvarec, 2011).

Recentemente, subpopulações celulares altamente especializadas foram identificadas. O paradigma Th1/Th2 foi acrescido de modelos que incluem outras subpopulações, mas não limitam a gama de funções das células Th1 e Th2 (Kheshtchin, 2010).

A infertilidade é definida como ausência de gravidez após um ano de relações sexuais frequentes e sem nenhum método de anticoncepção, sendo considerada primária quando na ausência prévia de gestação (Evers, 2002). A prevalência de infertilidade varia de 3,5 a 16,7% nos países desenvolvidos e de 6,9 a 9,3% nos menos desenvolvidos. Proporcionalmente à população mundial, corresponde a mais de 70 milhões de casais inférteis no mundo (Boivin, 2007).

Em 10 a 15% dos casos de infertilidade conjugal, ou seja, em aproximadamente onze milhões de casais inférteis, o fator causal da infertilidade é inexplicado, ou seja, o casal passa três anos tentando engravidar e, sem nenhuma causa aparente, não consegue (Hull, 1985).

O fator masculino é detectado em 30 a 40% dos casos, e o fator feminino é o responsável em 5 a 25% dos casos de infertilidade conjugal (Grandone, 2005). Assim, há aproximadamente dezoito milhões de mulheres inférteis na população mundial.

Até 50% das mulheres inférteis podem ser portadoras de endometriose e, entre as mulheres com endometriose, até 50% podem apresentar infertilidade (Schenken, 1999). Assim estima-se que haja nove milhões de mulheres inférteis devido a endometriose no mundo. A endometriose é definida como o crescimento de glândulas endometriais ativas e estroma fora da cavidade uterina. É uma doença ginecológica crônica e progressiva, geralmente diagnosticada em mulheres em idade reprodutiva (Droszol-Cop, 2012).

A endometriose tem correlação com fatores imunológicos e inflamatórios, como demonstrado pela alta concentração de macrófagos ativos, células T e B, e citocinas no fluido peritoneal. É considerada um processo inflamatório pélvico, em que há função alterada das células imunes no ambiente peritoneal. Os macrófagos produzem fatores de crescimento, prostaglandinas e citocinas que têm papel importante na angiogênese, inflamação, ativação de outras células, adesão e sobrevivência dos implantes endometriais. Estudos clínicos demonstraram maiores concentrações de marcadores imunológicos selecionados no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, como IL-4, IL-6, TNF- α , TNF- β e INF- γ (Harada, 2001; Iwabe, 2003; Kyama, 2003; Nap, 2004; Agic, 2006; Siristatidis, 2006; Ohata, 2008). A avaliação sérica de citocinas em mulheres com endometriose também mostrou aumento de algumas delas, como IL-6 (Iwabe, 2003), TNF- α (Cho, 2007) ou ambas (Bedaiwy, 2002). Entretanto, seu completo significado não é conhecido.

Devido ao intenso transtorno psicológico, físico e financeiro que a infertilidade inexplicada e a infertilidade com endometriose geram na vida pessoal e conjugal de

milhões de casais na população mundial, e motivados pelos estudos prévios que sugeriram correlação entre estas patologias e desequilíbrios imunológicos, questionamos se, nas mulheres portadoras de infertilidade inexplicada ou nas mulheres inférteis com endometriose, atendidas nos ambulatórios de Infertilidade e Revisão Puerperal do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), ocorreria polarização da resposta imunológica Th1 ou Th2, na perspectiva de contribuir para a uma melhor compreensão dos mecanismos etiopatogênicos destas doenças, e, desta forma, agregar conhecimento para linhas de pesquisa sobre seus tratamentos, focadas nas possíveis alterações imunológicas a que se relacionam, e corroborar a minimizar as consequências destas doenças na comunidade.

Para tentar esclarecer esta questão, foram realizadas a quantificação e comparação de algumas citocinas Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α) e de algumas citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) entre grupos de mulheres com infertilidade inexplicada, infertilidade com endometriose e mulheres férteis.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar se, no grupo de mulheres com infertilidade inexplicada ou no grupo de mulheres inférteis com endometriose atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), ocorre polarização da resposta imunológica citotóxica Th1 ou da resposta imunológica citoprotetora Th2.

2.2 Objetivos específicos

Quantificar e comparar a concentração de citocinas Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α) entre grupos de mulheres com infertilidade inexplicada, infertilidade associada à endometriose e mulheres férteis.

Quantificar e comparar a concentração de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) entre grupos de mulheres com infertilidade inexplicada, infertilidade associada à endometriose e mulheres férteis.

Analisar se nos casos onde a infertilidade é primária a quantificação e comparação da concentração de algumas citocinas Th1 e Th2 evidencia potencialização da questionável polarização da resposta imunológica citotóxica Th1 ou da resposta imunológica citoprotetora Th2 no grupo de mulheres com infertilidade inexplicada ou no grupo de mulheres com infertilidade associada à endometriose.

3. Sujeitos e Método

3.1 Desenho do estudo

Estudo de corte transversal.

3.2 Tamanho amostral

Nenhum trabalho igual a este nunca foi descrito na literatura, assim, para o cálculo do tamanho da amostra utilizaram-se dois estudos que apresentaram dosagem sérica das citocinas em mulheres com endometriose e mulheres férteis. A unidade da dosagem foi pg/ml, e suas descrições realizadas através de mediana e variação entre o percentil 25 e 75 (Bedaiwy, 2002), e através de suas médias e desvios padrões (Guerrero, 2003). Foi considerado o teste t pareado, nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. O Quadro 1 mostra o tamanho da amostra necessário.

Quadro 1- Tamanho da amostra

	Endometriose	Fértil	N
TNF- α	8.33(1.37,69.22)	1.37(1.37,1.37)	21
			Fonte: Bedaiwy, 2002
INF- γ	18,5 \pm 25.6	8,8 \pm 3,9	40
IL-2	12,4 \pm 7,4	14,62 \pm 7,4	487
IL-4	56,4 \pm 77,4	37,1 \pm 27,9	52
IL-10	178,1 \pm 155,2	175,3 \pm 179,5	> 10.000
			Fonte: Guerrero, 2003

Deve-se assumir o maior tamanho da amostra, porém a amostra maior que 10.000 bem como de 487 foram inviáveis devido a fatores temporais e financeiros. O tamanho da amostra de 52 mulheres em cada grupo seria suficiente para TNF- α , INF- γ e IL-4, e para as demais citocinas seria avaliado o poder do teste após o resultado de suas dosagens.

3.3 Seleção dos sujeitos

Foram selecionadas mulheres que preencheram os critérios de inclusão e exclusão no dia de suas consultas de rotina nos ambulatórios de Esterilidade e de Revisão Puerperal do CAISM-UNICAMP, no período de janeiro a junho de 2010.

3.3.1.a. Critérios de inclusão de mulheres inférteis com endometriose

Ter idade entre 18 e 40 anos, pelo menos um ano de relações sexuais sem uso de método anticoncepcional e sem ocorrência de gestação, endometriose diagnosticada através de visão direta por laparoscopia realizada há menos de um ano, e TCLE assinado.

3.3.1.b. Critérios de exclusão de mulheres inférteis com endometriose

Ter antecedente de doença auto-imune, câncer ou uso de drogas imunossupressoras, infecção aguda clínica ou sub-clínica detectada através de alteração de leucograma colhido no dia da inclusão no estudo, exame clínico e ginecológico, fator de infertilidade conhecido (exceto endometriose).

3.3.2.a. Critérios de inclusão de mulheres com infertilidade inexplicada

Ter idade entre 18 e 40 anos, pelo menos três anos de relações sexuais sem uso de método anticoncepcional e sem ocorrência de gestação, ter sido investigada quanto a causas anatômicas, infecciosas, hormonais e fator masculino, sendo todos os resultados considerados normais, e TCLE assinado.

3.3.2.b. Critérios de exclusão de mulheres com infertilidade inexplicada

Ter antecedente de doença auto-imune, câncer ou uso de drogas imunossupressoras, infecção aguda clínica ou sub-clínica detectada através de alteração do leucograma ou de exame clínico e ginecológico realizados no dia da inclusão no estudo e ter fator de infertilidade conhecido. Ter sintomas clínicos ou exames de imagem sugestivos de endometriose.

3.3.3.a. Critérios de inclusão de mulheres férteis

Ter idade entre 18 e 40 anos, pelo menos um filho vivo concebido nos últimos 12 meses, e TCLE assinado. .

3.3.3.b. Critérios de exclusão de mulheres férteis

Ter história de óbito fetal, aborto recorrente ou prematuridade, antecedente de doença auto-imune, câncer ou uso de drogas imunossupressoras, infecção aguda clínica ou sub-clínica detectada através de alteração do leucograma ou de exame clínico e ginecológico realizados no dia da inclusão no estudo. Apresentar sinais, sintomas ou exames de imagem sugestivos de endometriose.

3.4 Variáveis e conceitos

3.4.1 Independentes

Fertilidade, que foi dividida em três categorias:

- Mulheres inférteis com endometriose: mulheres com ausência de gravidez após pelo menos doze meses de atividade sexual regular sem a utilização de qualquer método contraceptivo e que apresentavam presença de tecido endometrial, com suas glândulas funcionantes e estroma, fora da cavidade uterina, diagnosticada por videolaparoscopia.

- Mulheres com infertilidade inexplicada: mulheres com ausência de gravidez após pelo menos trinta e seis meses de atividade sexual regular sem a utilização de qualquer método contraceptivo e que não apresentaram causas aparentes para a infertilidade, após a pesquisa hormonal, infecciosa, anatômica e de fator masculino.

- Mulheres férteis: mulheres com antecedente de pelo menos uma gestação bem sucedida, que terminou com parto a termo e recém-nascido vivo nos últimos 12 meses.

3.4.2 Dependentes

- Interleucina 2: citocina Th1 constituída por glicoproteína de 14 a 17 kD, produzida por linfócitos T CD4+. O resultado da sua dosagem foi expresso em picogramas por mililitro (pg/ml).

- Interleucina 4: citocina Th2 com quatro hélices, produzida pelos linfócitos T CD4+ do subgrupo Th2 e por mastócitos ativados. O resultado da sua dosagem foi expresso em picogramas por mililitro (pg/ml).

- Interleucina 10: citocina Th2 dimérica não-covalente, produzida por macrófagos ativados e células T reguladoras. O resultado da sua dosagem foi expresso em picogramas por mililitro (pg/ml).

- Fator de Necrose Tumoral- α : citocina Th1 produzida por fagócitos mononucleares ativados, que estimula as células endoteliais vasculares a expressar novas moléculas de adesão, induz macrófagos e células endoteliais a secretar quimiocinas, e promove apoptose de células alvo. O resultado da sua dosagem foi expresso em picogramas por mililitro (pg/ml).

- Interferon- γ : citocina Th1 produzida pelos linfócitos T e pelas células NK, que ativa os macrófagos na resposta imune inata e celular adaptativa. O resultado da sua dosagem foi expresso em picogramas por mililitro (pg/ml).

3.4.3 De controle

- Idade: número de anos completos de vida relatados pela paciente.
- Raça: cor da pele, auto-classificada em branca ou não branca.
- Antecedente gestacional: número de gestações, partos e abortamentos referidos pela mulher.
- Tipo de união: união estável ou não referida pela mulher.
- Uso de método anticoncepcional hormonal: sim ou não referido pela mulher.
- Comorbidades: sim ou não referido pela mulher, relatando qual comorbidade nos casos da resposta ser sim.
- Uso de medicações: sim ou não referido pela mulher, relatando qual medicação nos casos da resposta ser sim.

3.5 Técnicas, testes e exames

3.5.1 Dosagem das citocinas séricas

3.5.1.a. Obtenção das amostras de soro

Foram selecionadas 52 mulheres férteis, 52 mulheres com infertilidade inexplicada e 38 mulheres inférteis com endometriose. No dia de suas consultas de rotina em seus respectivos ambulatórios, as amostras de sangue das pacientes foram coletadas em tubos secos, sem anticoagulante e com gel de separação (Vacutainer®, BD, Brasil). Após homogeneização do sangue, os tubos foram mantidos em repouso, verticalmente, por 30

minutos para retrain o coágulo e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 1000g. O soro livre de células foi armazenado, em alíquotas de 1,5 mL, à temperatura de -20°C até o momento da dosagem das citocinas. No momento do ensaio, as amostras foram descongeladas completamente, submetidas à agitação em aparelho tipo “vortex” e novamente centrifugadas, para a separação de possíveis grumos.

3.5.1.b. Dosagem das citocinas nas amostras de soro

Para a determinação da concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α no soro das pacientes foi utilizado o “kit” comercial MILLIPLEX® map Human Cytokine/Chemokine (MPXHCYTO60KPMX – Millipore Corporation, Missouri, USA).

O “kit” é composto de microesferas codificadas com cores fluorescentes (plataforma LUMINEX® XMap® – Luminex Corporation, Austin, USA). De acordo com a codificação, cada microesfera é, individualmente, recoberta com anticorpos específicos para uma dada citocina. As citocinas séricas são seletivamente capturadas na microesfera e, posteriormente, reveladas por anticorpos de detecção, biotinizados, conjugados com ficoeritrina-estreptavidina (PE), que ficam aderidos à superfície. Finalmente, a suspensão de microesferas é transferida para um analisador de fluxo (LABScan™, USA), onde o laser excita simultaneamente o fluorocromo interno, marcador da microesfera e a PE, marcadora da citocina capturada. A concentração de cada citocina da amostra de soro das pacientes é determinada pela comparação da intensidade de fluorescência, da respectiva curva-padrão, realizada, simultaneamente, com o reagente padrão que acompanha o “Kit”, conforme instruções do fabricante (anexo 6).

Para a aquisição dos resultados, a placa foi transferida para o compartimento de leitura do analisador de fluxo (Luminex 100®), os valores médios da intensidade de fluorescência foram armazenados em arquivos digitais e os dados utilizados para o cálculo

das concentrações, utilizando o método logístico de 5 parâmetros. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando o Luminex® xPonent software.

3.6 Instrumentos para coletas de dados

Foi utilizado um questionário elaborado pelo pesquisador para preenchimento da Ficha de Estudo (anexo 5), após aceitarem ouvir explicações sobre a pesquisa e concordarem em participar.

3.7 Coleta de dados

Foi oferecida participação às possíveis mulheres selecionadas após revisão em seus prontuários. As que aceitaram ouvir explicações sobre o estudo e concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexos 3 e 4) e responderam ao Questionário para preenchimento da Ficha de Estudo (anexo 5) que foram lidos, explicados, aplicados, e preenchidos pelo pesquisador. Em seguida foram encaminhadas à sala de coleta de sangue para que se procedesse à obtenção das amostras, coletadas por uma enfermeira capacitada, no mesmo ambulatório de suas consultas.

O Protocolo de Pesquisa nº 081/2008 foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM (anexo 1), e o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP emitiu o parecer nº 281/2009 (anexo 2), aprovando-o sem restrições.

Depois de preenchido o questionário da Ficha de Estudo, os nomes das mulheres foram eliminados, persistindo nas fichas apenas o número do sujeito no trabalho, sem identificação do mesmo. Os dados coletados foram digitados em uma planilha do programa Excel 2007 que foi completada posteriormente, com os dados laboratoriais obtidos com a dosagem das citocinas em estudo.

Após a obtenção dos resultados das dosagens das citocinas finalizou-se o preenchimento da Ficha de Estudo, e foi realizada a análise estatística dos dados.

3.8 Controle de qualidade

Foi realizado controle de qualidade laboratorial em dois níveis para cada uma das variáveis seguindo a orientação dos produtores do kit Milliplex®, conforme tabela I, elaborada com os dados da tabela fornecida pelo produtor.

Tabela I. Valores de qualidade de controle para o kit Milliplex Human Cytokine. Catálogo # MPXHCYTO-60K-05. Catálogo do controle # MXH6060 Lote # HCC 101e HCC 201

Citocina	Nível do controle de qualidade		Valor esperado
IL-2	Controle	1	92 - 192 pg/ml
	Controle	2	501 - 1040 pg/ml
IL-4	Controle	1	84 - 174 pg/ml
	Controle	2	432 - 898 pg/ml
IL-10	Controle	1	110 - 229 pg/ml
	Controle	2	413 - 857 pg/ml
TNF- α	Controle	1	91 - 188 pg/m
	Controle	2	478 - 993 pg/ml
INF- γ	Controle	1	111 - 230 pg/ml
	Controle	2	532 - 1105 pg/ml

3.9 Processamento e análise dos dados

Concluída e revisada a digitação de todos os dados por dois revisores, a saber, o pesquisador e o estatístico, em planilha do programa Excel 2007 para Windows (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, EUA), os dados foram descritos através de média, desvio-padrão e mediana, e através de frequências absolutas (n) e relativas (%). Os grupos foram comparados em relação as variáveis através dos testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. As citocinas foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis, em caso de diferença significativa, prosseguiu-se com as comparações múltiplas (dois a dois) através do teste de Mann-Whitney. Nível de significância 5%, software: SAS versão 9.1.3. O poder foi de pelo menos 80% para as medidas na comparação entre os grupos.

3.10. Aspectos éticos

Foram seguidas as orientações propostas pela Declaração de Helsinque e suas revisões (WMA Declaration of Helsinki, 2008), assim como as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 1996).

As informações foram obtidas apenas pelo propósito da pesquisa.

O sujeito somente foi admitido após lhe ter sido lido e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo pesquisador no dia de sua consulta de rotina, recebido uma cópia do termo, tê-lo compreendido e o assinado.

Foi citado o desconforto da picada da agulha para a coleta da amostra de sangue, e que este procedimento não apresentava riscos previsíveis, uma vez que a enfermeira que o

realizou era capacitada, e as medidas anti-sépticas que o procedimento requer seriam seguidas.

Foi explicado que não haveria benefícios pessoais com a participação na pesquisa, e que os resultados encontrados, provavelmente não trariam nenhum benefício imediato para a população, mas que em ciências é assim que ocorre, e pequenos achados científicos se somam, e levam a achados maiores.


4. Publicação

Artigo 1

Polarization of Th1 and Th2 immune response analysis in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis

Aviso: Hemeroteca - São Paulo Medical Journal - Evidence for Health Care

De:

noreply@hemeroteca.com.br 

Aviso Importante!

O Manuscrito **Polarization of Th1 and Th2 immune response analysis in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis**(Protocolo: SPMJ000611/2012) teve o status modificado para: Submissão finalizada.

Associação Paulista de Medicina

08/10/2012 11:07:14

Original article

Título em inglês

Polarization of Th1 and Th2 immune response analysis in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis

Título em português

Análise da polarização da resposta imunológica Th1 e Th2 em mulheres com infertilidade inexplicada e inférteis com endometriose

Autores

João Agripino Guimarães^I, Egle Couto^{II}, Renata Zaccaria Simoni^{III}, Marcelo Luis Nomura^{IV}, Helaine Milanez^V, Renato Passini Jr^{VI}, Ricardo Barini^{VII}

^IMD. Postgraduate student, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{II}MD. Attending, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{III}MD. Postgraduate student, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{IV}MD. Attending, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^VMD, PhD. Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências

Médicas, Universidade Estadual de Campinas, (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{VI}MD, PhD. Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

^{VII}MD, PhD. Full Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

Local de desenvolvimento do trabalho

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

CONTEXT AND OBJECTIVE: Immunological alterations may be associated with infertility and endometriosis. The objective of this study was to check the polarization existence of Th1 or Th2 cytokines response in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis.

DESIGN AND SETTING: Cross sectional study at Center for Women's Integrated Healthcare (CAISM), University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil.

METHODS: 142 women were divided into three groups (52 with unexplained infertility, 38 infertile with endometriosis and 52 fertile) for measurement of Th1 cytokines (interleukin -2, tumor necrosis factor- α and interferon- γ), and Th2 cytokines (interleukins 4 and 10). Data were described by means, standard-deviations and median, and absolute and relative frequency tables. Variables were compared among the groups using Qui-square and Fisher Exact Test. Cytokines were compared using Kruskal-Wallis. Multiple comparisons two-by-two were done using Mann-Whitney test when a significant difference was detected, accepting a 5% significant level.

RESULTS: Interferon- γ levels were lower ($p = 0.0012$) and interleukin-4 levels were higher ($p = 0.0001$) in unexplained infertility compared to fertile women. Interferon- γ ($p = 0.0001$) and interleukin-4 ($p = 0.0005$) levels were higher in unexplained infertility compared to infertility with endometriosis. Women with primary infertility were found to have lower levels of interferon- γ and higher levels of interleukin-4 than fertile women.

CONCLUSION: The polarization of Th1 or Th2 cytokines response didn't occurred in unexplained infertility or infertility with endometriosis in the studied groups.

KEY WORDS: Cytokines; endometriosis; immunology; infertility; interleukins.

RESUMO

CONTEXTO E OBJETIVO: Alterações imunológicas podem estar associadas à infertilidade e endometriose. O objetivo deste estudo foi avaliar se na infertilidade inexplicada ou com endometriose ocorre polarização da resposta imunológica Th1 ou Th2.

TIPO DE ESTUDO E LOCAL: Corte transversal realizado no Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM), Universidade de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brasil.

MÉTODOS: 142 mulheres foram divididas em três grupos (52 com infertilidade inexplicada, 38 inférteis com endometriose e 52 férteis) para dosagem de citocinas Th1 (interleucina-2, fator de necrose tumoral- α e do interferon- γ) e citocinas Th2 (interleucinas 4 e 10). Os dados foram descritos através de média, desvio-padrão e mediana, e através de frequências absolutas e relativas. Os grupos foram comparados em relação às variáveis através dos testes de qui-quadrado ou exato de Fisher. As citocinas foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis; em caso de diferença significativa, foram feitas comparações dois a dois através do teste de Mann-Whitney e aceitou-se nível de significância 5%.

RESULTADOS: Menores níveis de interferon- γ ($p = 0,0012$) e maiores de interleucina-4 ($p < 0,0001$) foram detectados na infertilidade inexplicada comparados ao das férteis. Maiores níveis de interferon- γ ($p = 0,0001$) e de interleucina-4 ($p = 0,0005$) foram detectados na infertilidade inexplicada comparados ao das inférteis com endometriose. Na infertilidade primária houve menores níveis de INF- γ e maiores de IL-4 que nas férteis.

CONCLUSÃO: A polarização da resposta imunológica Th1 ou Th2 não ocorreu na infertilidade inexplicada ou com endometriose nos grupos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: citocinas; endometriose; imunologia; infertilidade; interleucinas.

Corpo do texto

INTRODUCTION

The prevalence of infertility ranges of 3.5 to 16.7% in developed countries and from 6.9 to 9.3% in the less developed nations. That means more than 70 million couples in the world trying to get pregnant who have been exposed to unprotected sexual intercourse for at least a year and do not get it¹. Infertility factors related to the male partner are responsible in 30 to 40% of cases, while the female factors are found in 5 to 25% of infertile couples, represented for about 18 million infertile women worldwide. In the left 10 to 15% of cases of infertility the responsible factors are unexplained, what means that some like 11 million of infertile couples are unsuccessfully trying to become pregnant for at least three years and there is no apparent cause for not getting it.² When female factors are involved, endometriosis may be found in up to 50% of cases.³ About 9 million infertile women have ectopic functioning endometrial glands and stroma, and that may alter the physiologic process of ovulation⁴ and lead to tubal obstruction.^{4,5} This explain most causes of infertility due to endometriosis, but not all of them, once the pathogenesis of endometriosis remains incompletely known. There are suggestions that modifications in cellular immunity can facilitate the successful implantation and induce development of ectopic endometrial fragments. The immune system works as a mediator of the body's dynamic balance. Its participation in human reproduction involves the entire process, since before the spermatozoid is deposited until later on fetus's birth. Modifications in the production of the substances comprising this system may result in alterations of reproductive process, contributing to the pathogenesis of endometriosis and directly or indirectly contributing to infertility⁶ Actions performed by the immune system involve cytokines, small proteins that participate in intercellular communication and stimulate the expression of surface markers

in the leukocytes. This ensures that the body is able to recognize external antigens, pathogens and sometimes alloantigens. Traditionally, the cytokines that collaborate in activating macrophages are the cytotoxic Th1-type, such as interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ), while those that participate in generating antibodies are the cytoprotective Th2-type, such as interleukin-4 and interleukin-10 (IL-4 and IL-10). Each group of cytokines, Th1 or Th2, stimulates its own production and inhibits the production of the cytokines from the other group, and this cross-effect may polarize immunological response.⁷ This response is known to act not only as a defense against external aggression, but it is also one of the factors that permit or inhibit embryo development and growth during implantation,⁸ and may be involved in infertility and endometriosis pathogenesis⁶. The present study was designed to evaluate the hypothesis that, in cases of unexplained infertility or infertility associated with endometriosis, polarization of the immune balance due to cytotoxic Th1 response or due to cytoprotective Th2 response may occur.

OBJECTIVE

The objective of this study was to check the polarization existence of Th1 or Th2 cytokines response in women with unexplained infertility or infertility with endometriosis by quantifying and comparing Th1 (IL-2, TNF- α and IFN- γ) and Th2 (IL-4 and IL-10) cytokine levels in those women.

METHODS

This work is a cross sectional study and once it hasn't ever been published anywhere else, calculation of sample size was based on studies that had reported the difference in TNF- α ⁹

and in IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10¹⁰ levels between women with endometriosis and fertile women. The paired t-test was used to compare the groups, with a significance level of 5% and power of the test of 80%. From January to June of 2010, 142 women were selected at infertility and postnatal follow-up outpatient clinics of the Center for Women's Integrated Healthcare (CAISM), University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, and enrolled in the study. From them, 52 were fertile women, 38 infertile with endometriosis and 52 with unexplained infertility. The fertile women included were considered to be the one who presents the expected balance of Th1 and Th2 cytokines for fertility. They had at least one living child and no history of fetal death, recurrent pregnancy loss or prematurity. The infertile women with endometriosis had been exposed to unprotected sexual intercourse for at least one year without becoming pregnant, in spite of the three years for the unexplained infertile women. All the women with endometriosis had been diagnosed following direct laparoscopic visualization performed less than one year previously. In the women who had received a diagnosis of unexplained infertility, possible anatomical, infectious and hormonal causes had all been investigated, as had the male factor, and all results were considered normal. These women had no clinical signs or imaging exams suggestive of the presence of endometriosis. All the participants were in fertile age, between 18 to 40 years old. They were invited to participate in the study on the day of a scheduled routine consultation, and those who accepted to participate were also interviewed on the same day. During the interview, data were collected on their skin color (self-reported), parity, marital status, infertility long, use of contraceptive methods, comorbidities and the use of any medication. Exclusion factors for all of the women consisted of a history of autoimmune disease, cancer or the use of immunosuppressive drugs, acute clinical or subclinical infection detected by the presence of abnormalities in the

white blood cell count performed on a sample collected on the day of admission to the study or abnormalities found at clinical or gynecological examination. For both of the infertile groups a known reason for infertility was an exclusion factor also, but endometriosis for the infertile group with endometriosis. After the patients had been provided with information regarding the study protocol and after they had agreed to participate in the study and signed the informed consent form, blood samples were collected in dry tubes without anticoagulant and with the use of separation gel (Vacutainer®, BD, Brazil), left to stand for 30 minutes to allow clot retraction and centrifuged for 10 minutes at 1000 g. The cell-free serum sample was stored in 1.5 ml aliquots at a temperature of -20°C until cytokine measurement. Levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 and IL-10 were measured in the serum of the women in the study using the commercial kit MILLIPLEX® map Human Cytokine/Chemokine (MPXHCYTO60KPMX – Millipore Corporation, Missouri, USA) and the flow analyzer (Luminex 100®), in accordance with the manufacturer's instructions. The mean values of fluorescence intensity were stored in digital files and the data were transformed into figures and tables using the Luminex® xPonent software program. The data were described using means, standard deviations and medians and by absolute (n) and relative (%) frequencies. Variables were compared between the groups using the chi-square test or Fisher's exact test. Cytokine levels were compared between the groups using the Kruskal-Wallis test and whenever differences were found to be statistically significant, multiple comparisons (2x2) were performed using the Mann-Whitney test. Significance level was defined as 5% and the software used for the statistical analysis was the SAS program, version 9.1.3. The study was conducted in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki and its revisions,¹¹ and the regulatory guidelines and legislation governing research involving human beings, as stipulated in Resolution

196/96 of the National Health Council.¹² The protocol of this study was approved by the Internal Review Board of the Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (FCM-Unicamp), under approval letter 281/2009.

RESULTS

A total of 142 women were evaluated in this study. From those, 52 were fertile, 38 infertile with endometriosis and 52 with unexplained infertility. Classification according to self-reported skin color shows that 77-84% of the participants were white and that there were no statistically significant differences between the three groups (Table 1). Of the fertile women, 48% had had only one successful pregnancy and 89% had delivered more than 60 days previously. Of the infertile women, 68 had primary infertility, 28 of the 38 women with endometriosis (74%) and 40 of the 52 women with unexplained infertility (77%). No differences were found between the three groups due to recurrent pregnancy loss or marital status (Table 1). Comparison of the mean age of the women in the three groups showed a statistically significant difference, which was also found in the 2x2 comparison, between the fertile women and the infertile women with endometriosis, and between the fertile women and the women with unexplained infertility. When the mean age of the two groups of infertile women was compared, no statistically significant difference was found (Table 2). Comparison of the mean and median values of the cytokines studied found no statistically significant difference between the fertile women and the infertile women with endometriosis (Table 3). When the fertile women were compared to the women with unexplained infertility, IFN- γ levels were found to be higher in the fertile women and IL-4 levels in the women with unexplained infertility. Both differences were statistically significant (Table 4). Comparing the two groups of infertile women, both IFN- γ and IL-4

levels were found to be significantly higher in the women with unexplained infertility (Table 5). When the fertile women were compared with the women with primary infertility, IFN- γ levels were higher and IL-4 levels were lower in the former (Table 6).

DISCUSSION

The three groups studied were similar with respect to self-reported skin color, prior history of recurrent pregnancy loss and marital status. Since the infertile women in both groups were undergoing investigation at infertility clinics and wanted to become pregnant, it was expected that the majority would be in a stable union, and this was found to be the case for all the women in these two groups. Although a statistically significant difference was found in the mean age of the women in the three study groups, it should be noted that they were all of reproductive age and that there were no women at the extremes of reproductive age;¹³ therefore, it is reasonable to consider the groups comparable in this respect. There was no statistically significant difference in mean age between the two groups of infertile women. The immune system is known to act directly or indirectly on the reproductive process⁶ and its action may be favorable or detrimental to the occurrence of a successful pregnancy.¹⁴ On this subject, debates have been published in the literature on the different immunological factors that affect the reproductive process and changes in cytokine levels have often been mentioned in relation to the different causes of infertility. Endometriosis is the one of the causes of female infertility most likely to trigger debates on immunological alterations.³ Nevertheless, no statistically significant differences were found in the cytokines evaluated in the present study between the group of fertile women and the infertile women with endometriosis. Similar findings were reported in a study in which IL-2, TNF- α , IFN- γ (Th1 cytokines), IL-4 and IL-10 (Th2 cytokines) levels were measured in the serum and

peritoneal fluid of women with and without endometriosis, statistically significant differences being found only with respect to IL-10 and IFN- γ and only in peritoneal fluid, levels being higher in the group of women with endometriosis ($p = 0.035$ and 0.039 , respectively). It was concluded that neither a Th1 nor a Th2 immunological response was predominant in the physiopathology of endometriosis but, rather, a combination of alterations in the two responses.¹⁵ Another cross sectional study that evaluated IL-18 (Th1) levels in the serum and peritoneal fluid of 34 infertile women with mild or moderate endometriosis and 22 fertile women found no evidence of any differences between the two groups. Nevertheless, a positive association was found between the serum and peritoneal levels of this cytokine in the patients with endometriosis ($r = 0.794$; $p = 0.0001$).¹⁶ When cytokine levels were compared between the fertile women and those with unexplained infertility, the results of the present study also showed higher levels of a Th1 cytokine, IFN- γ , in the former and of a Th2 cytokine, IL-4, in the latter. In these women, immunology may help clarify causes that have so far remained undetected. The results of this study, if confirmed in larger studies, may help exclude the cytokines that do not actively participate in the genesis of infertility or perhaps raise suspicion that these cytokines may act in some other way. A prospective study was conducted in which serum IL-6 and TNF- α levels were measured in women with unexplained infertility and in 44 fertile women on the third day of the menstrual cycle, and concluded that serum IL-6 levels were significantly higher in the women with unexplained infertility ($p < 0.001$) and that there was no statistically significant difference in TNF- α between the groups.¹⁷ These findings suggest that IL-6 is involved in the physiopathology of infertility when known causes other than those related to the immune system have been excluded. Therefore, new possibilities are appearing with respect to the importance of other interleukins less commonly studied in infertility.

Comparison of the two groups of infertile women, i.e. those with endometriosis and those with unexplained infertility, also resulted in findings that contradicted our initial hypothesis. The women with unexplained infertility had higher levels of both of a Th1 cytokine (IFN- γ) and a Th2 cytokine (IL-4). The results obtained in the present study are in agreement with the findings of a previous study in which no statistically significant differences were found in serum IL-2 (Th1), IL-10 (Th2) or TNF- α (Th1) levels in women with or without endometriosis.¹⁵ On the other hand, a 2-year evaluation of 96 infertile women of 22-43 years of age who were submitted to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles detected statistically significant differences. Interleukins 1 β , 6, 8, 12p70 and TNF (all Th1) and IL-10 (Th2) were measured in the peripheral blood of these women using flow cytometry. IL-6 and IL-8 were detected in the majority of samples. The presence of IL-1 β positively affected the percentage of implantation ($p = 0.004$), the percentage of women in whom this cytokine was found being greater among the group of women who conceived (62.5%) compared to those who failed to conceive (37.5%) ($p = 0.019$).⁸ The heterogeneity of the cytokines and the groups of women evaluated in each study makes comparison difficult.^{8,15-17} Nevertheless, there appears to be no predominance either of a Th1 or a Th2 response. Despite the heterogeneity in the studies, several have indicated a possible increase both in the Th1 and in the Th2 cytokines for the same group in question.^{8,15-17} The findings of the present study ratify these results. Likewise, when fertile women were compared with women with primary infertility, conflicting results were also reported. Lower levels of a Th1 cytokine (IFN- γ) and higher levels of a Th2 cytokine (IL-4) were found in the groups of infertile women. In the present study it was not possible to establish a pattern of increased levels of any single cytokine in the group of women with unexplained infertility or in those with endometriosis. Furthermore, there was no

suggestion of any predominance with respect to the Th1/Th2 cytokine ratio in the cases studied. As in the evolution of various important laboratory tests throughout the history of Medicine, the homogenization of techniques used to measure all the known cytokines, of which there are dozens, may permit the formation of panels of cytokines for each disease or for each group of patients, facilitating research and providing greater understanding for the causes, diagnosis and treatment of unexplained infertility and endometriosis. While that doesn't happen the measure of cytokines still not being considered within clinical practice.

CONCLUSION

The quantification and comparison of some Th1 and Th2 cytokines in fertile women, in infertile women with endometriosis and in women with unexplained infertility did not indicate a predominance of one type over the other in the groups studied.

REFERENCES

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1506-12.
2. Grandone E. Infertility and thrombophilia. *Thromb Res.* 2005;115 Suppl 1:24-7.
3. Schenken R, Burus W. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. In: *Clinical obstetrics and gynecology.* New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 42:586-601.
4. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertility and Sterility* - August 2008 (Vol. 90, Issue 2, Pages 247-257, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.093).

5. Nachtigall RD. International disparities in access to infertility services
Fertility and Sterility - April 2006 (Vol. 85, Issue 4, Pages 871-875, DOI:
10.1016/j.fertnstert.2005.08.066).
6. Souza SS, Voltarelli JC, Ferriani RA. I. Imunologia da reprodução humana. Medicina,
Ribeirão Preto. 1997;30:277-88. Available from:
http://www.fmrp.usp.br/revista/1997/vol30n2/imunologia_reproducao_humana.pdf.
Accessed in 2011 (Apr 20).
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S; [tradução de Reali C e outros]. Citocinas. In:
Imunologia Celular e Molecular. 6 ed. Elsevier Editora Ltda; 2008. p. 267-301.
8. Bonetti TC, Salomao R, Brunialti M et al. Cytokine and hormonal profile in serum
samples of patients undergoing controlled ovarian stimulation: interleukin-1beta predicts
ongoing pregnancy. Human Reprod. 2010;25(8):2101-6.
9. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, et al. Prediction of endometriosis with serum and
peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. Humam Reprod. 2002;17(2):426-31.
10. Guerrero CAH, Barba RJ, Pérez CR, et al. Endometriosis y abatimiento de las
características de la respuesta inmunológica citotóxica. Ginecol Obstet Mex.
2003;71(11):559-74. Available from:
[http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=23600
&id_seccion=407&id_ejemplar=2426&id_revista=40](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=23600&id_seccion=407&id_ejemplar=2426&id_revista=40). Accessed in 2011 (Apr 20).
11. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical
Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly,
Helsinki, Finland, June 1964, and amended by 59th WMA General Assembly, Seoul,
October 2008.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética* 1996;4(2) suplemento:15-25.
13. World Health Organization (WHO). Adolescent pregnancy. Geneva: WHO; 2009 [cited 2009 Jan 20]. Available from:
http://www.who.int/making_pregnancy_safer/topics/adolescent_pregnancy. Accessed in 2011 (Apr 20).
14. Caetano MR, Couto E, Passini R Jr, Simoni RZ, Barini R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *Sao Paulo Med J*. 2006;124(4):181-5.
15. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1373-9.
16. Glitz C, Souza CA, Rodini GP, et al. Peritoneal and serum interleukin-18 levels are not increased in women with minimum or mild endometriosis. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(11):1039-43.
17. Demir B, Guven S, Guven ES, Atamer Y, Gul T. Serum IL-6 level may have role in the pathophysiology of unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(4):261-7.

The present study was part of the Master's thesis of a Postgraduate student from Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil, João Agripino Guimarães, to be presented in 2011.

Sources of funding: This work received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), under the protocol 2009/072714.

Conflict of interest: none

Address **for** **correspondence:**

Egle Couto

Rua Bernardo Jose Sampaio, 339 sl. 33

Vila Itapura

Campinas (SP) — Brasil

CEP 13020-450

Tel. (+55 19) 3241 4036

E-mail: egle.couto@uol.com.br

TABLES

Table 1. Demographic characteristics (percentage)

Characteristic	Group			P-value
	Fertile	Infertile with endometriosis	Unexplained infertility	
White	77	84	65	0.114
No pregnancy	-	74	77	-
Marital status	94	100	100	0.112
n	52	38	52	

Table 2. Comparison of the mean age in the three groups

	Group			P-value
	Fertile	Infertile with endometriosis	Unexplained infertility	
Mean age (years)	27.7 (18-39)	32.8 (23-39)	31 (20-38)	0.0001
	27.7	32.8	-	0.0001
	27.7	-	31	0.005
	-	32.8	31	0.675
N	52	38	52	

Table 3. Comparison of the mean and median values of the cytokines studied in fertile and infertile women with endometriosis

Cytokine	Group						P-value
	Fertile			Infertile with endometriosis			
	Mean	SD*	Median	Mean	SD*	Median	
INF- γ	1.4	4.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.169
IL-2	3.4	12.5	0.2	5.5	15	0.5	0.512
IL-10	5.6	15.5	1	37.2	162.2	0.7	0.524
TNF- α	6.9	4.8	5.9	5.6	2.8	5.2	0.070
IL-4	1.6	9.1	0	0.69	2.88	0.07	0.134
(n)	52			38			

*SD – standard deviation

Table 4. Comparison of the mean and median values of the cytokines studied in fertile and unexplained infertility

Cytokine	Group						P-value
	Fertile			Unexplained infertility			
	Mean	SD*	Median	Mean	SD*	Median	
INF- γ	1.4	4.5	0.4	1	2.1	0.6	0.0012
IL-2	3.4	12.5	0.2	4	8.9	0.3	0.512
IL-10	5.6	15.5	1	23.4	120.1	1	0.524
TNF- α	6.9	4.8	5.9	6.9	2.7	6.4	0.070
IL-4	1.6	9.1	0	4.8	33.4	0.15	<0.0001
(n)	52			52			

*SD – standard deviation

Table 5. Comparison of the mean and median values of the cytokines studied in infertile women with endometriosis and unexplained infertility

Cytokine	Group						P-value
	Infertile with endometriosis			Unexplained infertility			
	Mean	SD*	Median	Mean	SD*	Median	
INF- γ	0.4	0.3	0.3	1	2.1	0.6	0.0001
IL-2	5.5	15	0.5	4	8.9	0.3	0.512
IL-10	37.2	162.2	0.7	23.4	120.1	1	0.524
TNF- α	5.6	2.8	5.2	6.9	2.7	6.4	0.070
Il-4	0.69	2.88	0.07	4.8	33.4	0.15	<0.0005
(n)	38			52			

*SD – standard deviation

Table 6. Comparison of the mean and median values of the cytokines studied in fertile women and women with primary infertility

Cytokine	Group						P-value
	Fertile			Primary infertility			
	Mean	SD*	Median	Mean	SD*	Median	
INF- γ	1.4	4.5	0.4	0.6	0.6	0.5	0.0498
IL-2	3.4	12.5	0.2	4.8	12.9	0.2	0.9199
IL-10	5.6	15.5	1	37.3	158.8	0.9	0.9895
TNF- α	6.9	4.8	5.9	6.4	3	6.1	0.8491
IL-4	1.6	9.1	0	4	29.5	0.15	<0.0001
(n)	52			52			

5. Conclusões

A concentração das citocinas Th1 IL-2 e TNF- α foi similar entre as mulheres com infertilidade inexplicada, infertilidade com endometriose e mulheres férteis. A citocina citotóxica INF- γ foi detectada em menores concentrações nas mulheres com infertilidade inexplicada, quando comparadas com mulheres inférteis com endometriose e com mulheres férteis.

A concentração da citocina Th2 IL-10 foi similar entre as mulheres com infertilidade inexplicada, infertilidade com endometriose e mulheres férteis. A citocina citoprotetora IL-4 foi detectada em maiores concentrações nas mulheres com infertilidade inexplicada, quando comparadas com mulheres inférteis com endometriose e com mulheres férteis.

A quantificação e a comparação da concentração das citocinas Th1 IL-2, TNF- α e INF- γ e das citocinas Th2 IL-4 e IL-10 não evidenciou polarização da resposta imunológica citotóxica ou citoprotetora em mulheres com infertilidade inexplicada ou inférteis com endometriose.

A quantificação e a comparação da concentração das citocinas Th1 IL-2, TNF- α e INF- γ e das citocinas Th2 IL-4 e IL-10 nas mulheres com infertilidade primária não evidenciou potencialização da polarização da resposta imunológica citotóxica ou citoprotetora em mulheres com infertilidade inexplicada ou inférteis com endometriose.

6. Referências Bibliográficas

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S; [tradução de Reali C e outros]. Citocinas. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Elsevier Editora Ltda; 2008. p. 267-301.
2. Agic A, Xu H, Finas D, Banz C, Diedrich K, Hornung D. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol Obstet Invest* 2006; 62: 139–147.
3. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):426-31.
4. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1506-12.
5. Bonetti TCS, Salomao R, Brunialti M, Braga DPAF, Borges Jr. E, e Silva IDC - Cytokine and hormonal profile in serum samples of patients undergoing controlled ovarian stimulation: interleukin-1 β predicts ongoing pregnancy - *Human Reproduction*, Vol.0, Nº 0 pp. I-6, 2010 - doi:10.1093/humrep/deq171.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética* 1996;4(2) suplemento:15-25.
7. Cho SH, Oh YJ, Nam A et al. Evaluation of serum and urinary angiogenic factors in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 497–504.

8. Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V. Selected cytokines and glycodelin A levels in serum and peritoneal fluid in girls with endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 38, No. 10: 1245–1253, October 2012. doi:10.1111/j.1447-0756.2012.01860.x.
9. Evers JL. Female subfertility. *Lancet.* 2002; 360:151-159.
10. Grandone E. Infertility and thrombophilia. *Thromb Res.* 2005; 115 Suppl 1:24-7.
11. Guerrero CAH, Barba RJ, Pérez CR, Ramirez NV, Eguiluz DC, Vásquez AC. Endometriosis y abatimiento de las características de la respuesta inmunológica citotóxica. *Ginecol Obstet Mex.* 2003 Nov; 71:559-74.
12. Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 76: 1–10.
13. Hull, M.G., Glazener, C.M., Kelly, N.J., Conway, D.I., Foster, P.A., Hinton, P.A., Coulson, C., Lambert, P.A., Watt, E.A., Desai, K.M. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985 December 14; 291(6510): 1693–1697. PMID: PMC1418755.
14. Iwabe T, Harada T, Sakamoto Y et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced serum interleukin-6 concentrations in patients with ovarian endometriomas. *Fertil Steril* 2003; 80: 300–304.
15. Kheshtchin N, Gharagozloo M, Andalib A, Ghahiri A, Maracy MR, Rezaei A. The expression of Th1- and Th2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy. *American Journal of Reproductive Immunology* 2010 Aug 1;64(2):104–12.
16. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D’Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 123–131.

17. Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, Toldi G, Stenczer B, Szarka A, et al. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 2011 Sep;91(1-2):56-63.
18. Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 233-244.
19. Ohata Y, Harada T, Miyakoda H, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N. Serum interleukin-8 levels are elevated in patients with ovarian endometrioma. *Fertil Steril* 2008; 90: 994-999.
20. Paulesu L, Bhattacharjee J, Bechi N, Romagnoli R, Jantra S, Ietta F. Pro-inflammatory cytokines in animal and human gestation. *Current Pharmaceutical Design* 2010;16(32):3601-15.
21. Schenken R, Burus W. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. En: *Clinical obstetrics and gynecology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 42:586-601.
22. Singh M, Kindelberger D, Nagymanyoki Z, Ng SW, Quick CM, Elias KM, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors and inducer in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *Gynecologic Oncology* 2011 Jul;122(1):178-82.
23. Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 162-170.
24. Souza SS, Voltarelli JC, Ferriani RA. - I. Imunologia da reprodução humana. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 277-288, abr./jun. 1997.
25. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly,

Helsinki, Finland, June 1964, and amended by 59th WMA General Assembly, Seoul,
October 2008.

7. Anexos

7.1 Anexo 1 - Carta de Aprovação da Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM



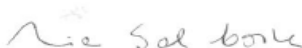
Comissão de Pesquisa do DTG / CAISM

Campinas, 19 de janeiro de 2009

Protocolo nº: 081/2008

O protocolo de pesquisa "*Quantificação e comparação de algumas citocinas tipo Th1 e Th2 em mulheres inférteis sem causa aparente ou devido à endometriose, e mulheres férteis*" do pesquisador João Agripino Guimarães sob a orientação da Profa. Dra. Egle Cristina Couto de Carvalho foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM em 15/01/2009.

Atenciosamente,


p/ Profa. Dra. Ellen Hardy
Presidenta

7.2 Anexo 2 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM - UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/04/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 281/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0211.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "QUANTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE ALGUMAS CITOCINAS TIPO TH1 E TH2 EM MULHERES INFÉRTEIS SEM CAUSA APARENTE OU DEVIDO À ENDOMETRIOSE, E MULHERES FÉRTEIS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: João Agripino Guimarães

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/04/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/04/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar s níveis séricos de citocinas padrão Th1 e Th2 em mulheres inférteis sem causa aparente e com endometriose.

III - SUMÁRIO

Será realizado um estudo de corte transversal com 156 mulheres que serão atendidas nos ambulatórios de Infertilidade e de Revisão Puerperal do CAISM/UNICAMP. Serão selecionados três grupos com 52 mulheres cada, divididos em mulheres férteis, inférteis com endometriose, e inférteis se causa aparente, da quais serão coletadas amostras de sangue periférico no dia de suas consultas de rotina, que servirão de substrato para a dosagem da interleucina-2 e do fator de necrose tumoral- α , citocinas Th1, e do interferon- γ , das interleucinas-4 e 10, citocinas Th2, usando o kit MILLIPLX™, catálogo MPXHCYTO-60K-05, com leitura pelo método Luminex® xMAP®. As concentrações encontradas em cada grupo serão analisadas pelo teste de kruskal-Wallis para calcular o valor-P total, que testarão a hipótese nula, e o teste de Wilcoxon para comparar as concentrações das citocinas apresentadas por cada grupo duas a duas. Caso se confirme predomínio de alguma destas citocinas em um dos grupos, outras citocinas poderão ser avaliadas, e se confirmado predomínio Th1 ou Th2 em alguma destas doenças, pesquisas sobre o estabelecimento de terapêutica individualizada para cada doença poderão ocorrer.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se projeto de pesquisa para o mestrado que aborda assunto de relevância para obtenção de novos conhecimentos acerca da resposta imune relacionadas a algumas citocinas tipo Th1 e Th2 em mulheres inférteis sem causa aparente ou devido à endometriose, e mulheres férteis. O projeto está bem redigido, o desenho do estudo é adequado, apresenta critérios de inclusão e exclusão definidos adequadamente. Os procedimentos para identificação dos casos estão descritos adequadamente. A metodologia a ser empregada está bem descrita. Os aspectos

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



éticos estão adequadamente abordados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequadamente redigido e em linguagem adequada.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

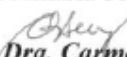
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de abril de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.3 Anexo 3- TCLE das mulheres inférteis com endometriose ou com infertilidade inexplicada

Pesquisador responsável: João Agripino Guimarães

A endometriose é uma doença das mulheres que além da dor que pode causar na barriga, principalmente durante a menstruação, pode fazer com que seja difícil engravidar. Não se sabe ao certo porque ela ocorre. Esta pesquisa irá estudar uma de suas possíveis causas. Parece que tanto na endometriose como na dificuldade de engravidar existem alterações na quantidade de algumas proteínas do meu sangue. Uma enfermeira treinada irá tirar um pouco de sangue do meu braço até encher uma seringa pequena, e haverá o desconforto da picada, sem outros riscos previsíveis, porque será feita toda a limpeza necessária para tirar este sangue, que será usado pelo laboratório para ver a quantidade de algumas destas proteínas, e se esta quantidade está errada em alguma destas doenças. Se for verdade que existe alteração na quantidade destas proteínas, outras pesquisas poderão ser feitas para descobrir como tratar esta alteração, e melhorar o tratamento destas doenças. Não receberei nenhum reembolso em dinheiro ou qualquer outro tipo de reembolso por participar, assim como não terei nenhum benefício imediato com esta pesquisa, nem serei punida ou colocada para fora deste ambulatório caso não queira participar, ou queira desistir a qualquer momento. Meu nome não aparecerá na pesquisa, apenas os dados tirados do estudo do meu sangue, sem nenhuma identificação que leve a descobrir quem eu sou. A qualquer momento poderei tirar as dúvidas que tiver sobre a pesquisa com o pesquisador responsável pelo telefone 19- 3243 1317.

Se tiver alguma dúvida ou reclamação sobre como esta pesquisa está sendo realizada, posso entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp pelo telefone 19- 3521 8936.

Declaro que o pesquisador leu e me explicou este termo, e que eu o compreendi, e recebi uma cópia igual a este que assinei concordando em participar voluntariamente desta pesquisa.

Ass: _____

7.4 Anexo 4 - TCLE das mulheres férteis

Pesquisador responsável: João Agripino Guimarães

A endometriose é uma doença das mulheres que além da dor que pode causar na barriga, principalmente durante a menstruação, pode fazer com que seja difícil engravidar. Não se sabe ao certo porque ela ocorre. Esta pesquisa irá estudar uma de suas possíveis causas, que parece ser alterações na quantidade de algumas proteínas do sangue. Uma enfermeira treinada irá tirar um pouco de sangue do meu braço até encher uma seringa pequena, e haverá o desconforto da picada sem outros riscos previsíveis, pois será feita toda a limpeza necessária para tirar este sangue, que será usado para ver a quantidade de algumas destas proteínas, e comparar com a quantidade que as mulheres que tem dificuldade de engravidar devido à endometriose ou por causa não aparente apresentarão, e se esta quantidade está alterada em alguma destas doenças. Se for verdade que existe alteração nesta quantidade, outras pesquisas poderão ser feitas para descobrir como tratar esta alteração, e melhorar o tratamento destas doenças. Não receberei nenhum reembolso em dinheiro ou qualquer outro tipo de reembolso por participar, assim como não terei nenhum benefício imediato com esta pesquisa, nem serei punida ou colocada para fora deste ambulatório caso não queira participar, ou queira desistir a qualquer momento. Meu nome não aparecerá na pesquisa, apenas os dados tirados do estudo do meu sangue, sem nenhuma identificação que leve a descobrir quem eu sou. A qualquer momento poderei tirar as dúvidas que tiver sobre a pesquisa com o pesquisador responsável pelo telefone 19- 3243 1317, e se tiver alguma dúvida ou reclamação sobre como esta pesquisa está sendo realizada, posso entrar em contato com a secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp pelo telefone 19- 3521 8936.

Declaro que o pesquisador leu e me explicou este termo, e que eu o compreendi, e recebi uma cópia igual a este que assinei concordando em participar voluntariamente desta pesquisa.

Ass: _____

7.5 Anexo 5 - Formulário para coleta de dados

Número no estudo.....

Idade [] anos

Raça [] branca [] não branca

Paridade G[] PN[] PC[] AE[] AP[] CTG[] FV[]

Tempo do último parto [] anos

União civil [] estável [] não estável

Tempo de infertilidade [] anos [] NSA

Endometriose [] sim [] não

Tempo de diagnóstico laparoscópico de endometriose [] meses [] NSA

Uso de MAC hormonal [] sim, há [] meses [] não

Tipo [] oral combinado [] injetável mensal

[] injetável trimestral outro _____

Comorbidades/ uso de medicações _____

IL-2 [] pg/ml

TNF- α [] pg/ml

IL-4 [] pg/ml

INF- γ [] pg/ml

IL-10 [] pg/ml

-----recortar

Número no estudo.....

nome _____ HC _____

7.6 Anexo 6 – Descrição do método para dosagem das citocinas segundo o manual do fabricante

O ensaio permite detectar os seguintes limites mínimos em pg/ml: IFN- γ = 0,1; IL-2= 0,3; IL-4= 0,6; IL-10= 0,3 e TNF- α = 0,1.

Conforme instruções do fabricante, os testes foram realizados com os reagentes mantidos na temperatura ambiente (20-25°C), em microplaca de 96 poços com o fundo constituído de membrana filtrante (Multi-ecrã BV, Millipore, Missouri, USA). Para evitar que a membrana tivesse contanto com qualquer superfície, durante a distribuição dos reagentes e períodos de incubações, a placa foi mantida ajustada em um suporte. Cada poço da placa é identificado pelo número da coluna e pela letra da linha correspondente à localização, conforme esquema apresentado na figura 1 a seguir:

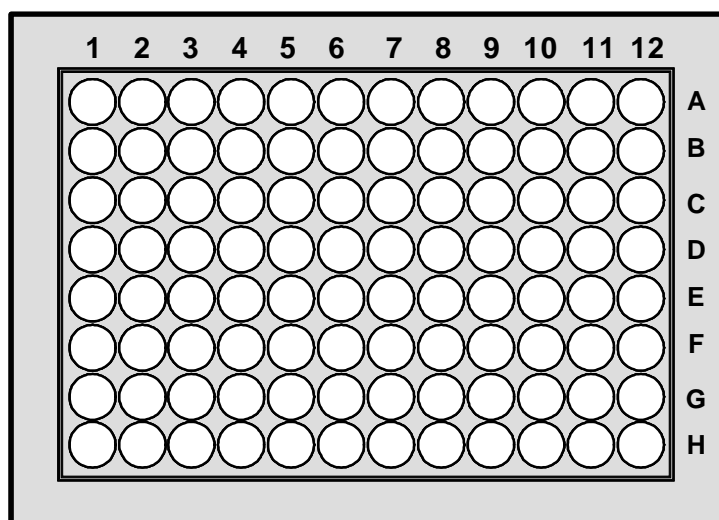


Figura 1: Representação esquemática da microplaca com 96 poços, Multi-Ecrã BV, Millipore, Missouri, USA.

Os testes foram realizados com o volume de 25 μ l das amostras soro das pacientes, ou dos controles, ou das diluições seriadas da amostra padrão. Considerando-se

que os testes com os controles e padrões são realizados em duplicatas, foram necessárias duas placas para avaliar a totalidade das 142 amostras.

Inicialmente, para evitar aderência inespecífica de proteínas séricas à membrana filtrante e a consequente obstrução dos seus microporos, em cada um dos 96 poços foram adicionados 200 µl de tampão de ensaio (fornecido pelo fabricante) promovendo a completa saturação prévia da membrana. Após selar e manter a placa em agitação, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, o excesso de tampão de ensaio foi removido com auxílio de um aspirador à vácuo Manifold®(Millipore, Missouri, USA), acoplado à parte inferior da placa, onde está localizada a membrana.

A seguir, na primeira e na segunda placa, aos poços 1A e 1B foram adicionados 25 µl do tampão de ensaio, reservados para controle negativo (0,0 µg/ml), nos poços de 1C à 2F foram pipetados, em duplicata, 25 µl de cada uma da diluição seriada (razão 1:5) do soro padrão, correspondendo as seguintes concentrações: 3,2 µg/ml, 16 µg/ml, 80 µg/ml, 400 µg/ml, 2000 µg/ml e 10.000 µg/ml. A média dos valores da intensidade de fluorescência correspondente a estas posições foram utilizadas para a elaboração das curvas-padrão. Nas posições 2G e 2H pipetou-se 25 µl do controle de qualidade (positivo) 1 e nas posições 3A e 3B pipetou-se 25 µl do controle de qualidade 2. Os demais poços da primeira placa foram ocupados, em sequência, com 25 µl das amostras de soro das pacientes até a amostra 78. Na placa 2, pipetou-se, sequencialmente, a partir do poço 1A até 12H, 25 µl das amostras 79 à 142. A todos os poços foram adicionados mais 25 µl de tampão de ensaio e 25 µl da solução Matrix, que acompanha o “kit”, previamente reconstituída em 5ml de água destilada. Em seguida foram adicionados 25 µl da suspensão contendo as microesferas em tampão diluente. Finalmente as placas foram cuidadosamente agitadas, seladas e mantidas em incubação, a 4°C, por 18 horas, em agitador orbital. Após o

período de incubação, com auxílio do aspirador a vácuo, o fluido foi removido e as microesferas lavadas 2 vezes com a adição de 200 µl de solução tampão a cada poço das placas. Após a remoção do excesso de tampão, pelo contato do fundo da placa com papel absorvente, foram adicionados 25 µl do anticorpo de detecção (específico para citocinas) em todos os poços e a placa selada e mantida, em agitação orbital, por uma hora, a temperatura ambiente. Em seguida, sem nenhuma remoção a vácuo, em todos os poços, foram adicionados 25 µl de ficoeritrina-estreptavidina e a placa novamente selada e incubada por mais 30 minutos, em agitação, a temperatura ambiente. Após esta segunda incubação, o fluido foi removido a vácuo e as microesferas lavadas duas vezes com a adição de 200 µl de tampão de lavagem. Finalmente, a cada poço, foram adicionados 150 µl de “Sheath Fluid” para resuspender as microesferas e a placa agitada por 5 minutos.