



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Pesquisa de células inflamatórias em aspirados endometriais e sua correlação em situações patológicas**

**Ana Catarina Mesquita Dionísio**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Dr. Jayson William Meyer  
Coorientador: Professor Doutor José Martinez de Oliveira

**Covilhã, maio de 2014**

# Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, a quem devo tudo o que sou, e ao Pedro, pelo apoio incondicional.

## Agradecimentos

...ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira por todo o apoio e disponibilidade.

...ao Dr. Jayson William Meyer pela pronta ajuda prestada.

...à Dra. Paula Pestana pela sua dedicação e interesse no projeto.

...a todos os colaboradores do laboratório do CHCB que me auxiliaram nas muitas horas aí dispendidas.

...a toda a minha família e amigos por estarem sempre presentes ao longo desta caminhada.

## Resumo

**Objetivos:** Uma vez que na cavidade uterina acontecem fenômenos importantes como os relacionados com o estabelecimento da gravidez, o ambiente endometrial começou cedo a ser estudado, tendo sido evidenciado que no endométrio existe um processo inflamatório basal que possibilita que tudo ocorra como é suposto, ou seja que todas as funções do sistema reprodutor feminino sejam desempenhadas. Mais tarde, tentou-se perceber o que acontecia a esse mesmo processo inflamatório em situações patológicas, infertilidade inexplicada, ou simplesmente em mulheres que apresentavam queixas sintomatológicas. De uma maneira geral, os estudos demonstraram que algumas células inflamatórias, de que são exemplo os macrófagos, os mastócitos e os eosinófilos, se encontravam aumentadas na maioria dessas situações clínicas anômalas. Uma vez que a inflamação faz parte de processos fisiológicos e patológicos será interessante tentar relacionar de forma qualitativa e quantitativa as células com as situações clínicas, a fim de tentar definir padrões que sirvam de marcadores biológicos. Neste trabalho, procurou-se avaliar metodologias de estudo das células inflamatórias (macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), em quadros ginecológicos diversos (pólipos endometriais, metrorragias, infertilidade, miomas uterinos, septo uterino, sinéquias, atrofia quística do endométrio, adenomiose e grupo sem patologia), e tentar relacioná-los.

**Materiais e Métodos:** após consentimento informado, 34 mulheres com indicação para exame histeroscópico aceitaram participar no estudo. 2 delas não toleraram a realização completa do exame, impossibilitando a recolha do lavado endometrial. Assim, foram recolhidas 32 amostras, que foram fixadas com álcool a 50%, em partes iguais, e posteriormente refrigeradas. De seguida, foram centrifugados, durante 5 minutos a 1500 rotações por minuto, cerca de 3mL da amostra que fora anteriormente colocada no cytospin. Após a centrifugação foram projetados em lâminas e coradas de May Grunwald Giemsa para visualização ao microscópio ótico.

**Resultados:** das 32 amostras recolhidas, 6 estavam em avançado estado de degradação impossibilitando a sua leitura. Nas restantes 26 amostras, foi possível identificar células epiteliais em quase todas, mas também, embora menos frequentemente e em menor quantidade, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, que eram o objeto de estudo, e ainda neutrófilos e basófilos. Os macrófagos estavam em maior quantidade em casos de pólipos endometriais, e de seguida em casos de infertilidade; os mastócitos surgiram mais raramente, apenas em casos de pólipos endometriais, infertilidade e miomas uterinos. Os neutrófilos estavam presentes sobretudo em casos de miomas uterinos, enquanto os eosinófilos foram encontrados em número escasso em casos de pólipos endometriais, miomas uterinos, adenomiose e no grupo sem patologia. Os basófilos foram visualizados em casos de pólipos

Pesquisa de células inflamatórias em aspirados endometriais e sua correlação em situações patológicas

endometriais, metrorragias e miomas uterinos. Estes resultados estão de acordo, em grande parte, com os da literatura.

Conclusões: Podemos concluir que a metodologia utilizada permite identificar as células inflamatórias de interesse nas amostras recolhidas e ter uma ideia aproximada da sua frequência em cada situação clínica apresentada pelas mulheres que constituíram a amostra. Uma vez testado o modelo, para melhor exatidão dos resultados e para melhor correlação com as situações patológicas, seria importante, no futuro, constituir uma amostra de maiores dimensões, comparar com o estudo em material fresco sem fixador e quantificá-las, utilizando a citometria de fluxo.

## Palavras-Chave

Células inflamatórias, fluido endometrial, macrófagos, mastócitos, eosinófilos.

## Abstract

**Objectives:** Once important phenomena occur in the uterine cavity such as the ones related to the establishment of pregnancy, the endometrial environment began early to be studied, having been shown that there is a basal endometrial inflammatory process that enables that everything happens as it is supposed to, that is all the functions of the female reproductive system are performed. Later, we tried to understand what happened to the same inflammatory process in pathological situations, unexplained infertility, or simply women who had symptomatic complaints. In general, studies have shown that some inflammatory cells, such as, macrophages, mast cells and eosinophils were increased in the majority of these abnormal clinical situations. Since inflammation is part of physiological and pathological processes it will be interesting to try to relate qualitative and quantitative the cells with the clinical situations in order to try to set standards that serve as biological markers. In this study we tried to evaluate methodologies for the study of inflammatory cells (macrophages, mast cells, neutrophils, eosinophils and basophils), in various gynecological situations (endometrial polyps, metrorrhagia, infertility, uterine fibroids, uterine septum, synechia, cystic endometrial atrophy, adenomyosis and group without pathology), and tried to relate them.

**Materials and Methods:** After informed consent, thirty-four women with indication for hysteroscopy exam agreed to participate in the study. Two of them did not tolerate a complete examination, not permitting the collection of endometrial washed. Thus, thirty-two samples were collected, which were fixed with 50% alcohol, in equal parts, and then refrigerated. Then, 3 ml of the sample, which were previously placed in the cytospin, were centrifuged for 5 minutes at 1500 rotations per minute. After centrifugation they were projected on slides and stained with May Grunwald Giemsa to be visualized through an optical microscope.

**Results:** Of the thirty-two samples collected, six of them were in an advanced state of degradation, making it impossible to read them. In the remaining twenty-six samples it was possible to identify epithelial cells in most of them, but also, macrophages, mast cells, eosinophils, which were object of study, less frequently and to a lesser extent, and neutrophils and basophils. The macrophages were more significant in cases of endometrial polyp, and in cases of infertility; mast cells appeared more rarely, only in cases of endometrial polyps, infertility and uterine fibroids. Neutrophils were present mainly in cases of uterine fibroids, while eosinophils were found in small number in endometrial polyps, uterine fibroids, adenomyosis and the group without pathology situations. Basophils were seen in cases of endometrial polyps, metrorrhagia and uterine fibroids. These results fulfill at large what was expected, taking in consideration the papers already published on the subject.

Conclusions: We can conclude that the methodology used allows to identify the inflammatory cells of interest in the samples collected, and enable to have a rough idea of their frequency in each clinical situation presented by the women who were part of the sample. Once the model was tested, and in order to achieve better accurate results and better correlation with pathological situations it would be important, in the future, to constitute a larger sample, analyze the samples without fixation and quantify them using flow cytometry.

## Keywords

Inflammatory cells, endometrial fluid, macrophages, mast cells, eosinophils.

# Índice

Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Palavras-Chave.....	VI
Abstract.....	VII
Keywords.....	IX
Índice.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Acrónimos.....	XIII
Introdução.....	1
Sumário da revisão.....	8
Objetivo do presente trabalho.....	9
Material 1: Senhoras a incluir.....	10
Material 2: Amostras, armazenamento, tratamento e avaliação ao microscópio ótico.....	11
Resultado esperado.....	12
Resultados.....	13
Discussão.....	22
Limitações do estudo.....	25
Conclusão.....	26
Bibliografia.....	28

## Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo Menstrual.....	2
Figura 2 - Linhagem Mieloide.....	3
Figura 3 - Neutrófilo visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.....	14
Figura 4 - Macrófago visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.....	14
Figura 5 - Macrófago visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.....	15
Figura 6 - Células epiteliais visualizadas ao microscópio ótico na ampliação x100 .....	15
Figura 7 - Mastócito visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.....	16

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos diferentes tipos celulares nas várias amostras de acordo com a faixa etária da mulher de onde se recolheu o aspirado endometrial.....	21
---	----

# Lista de Acrónimos

TLRs - Toll-Like receptors

MMPs - matrix metalloproteinases

VEGF - vascular endothelial growth factor

SELDI-TOF-MS - surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

HPLC-MS/MS - in-solution digestion followed by reverse phase high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

SDS-PAGE - protein separation by denaturing one-dimensional electrophoresis

2D-PAGE - two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

HIV - human immunodeficiency virus

# Introdução

A composição celular do fluido endometrial humano cedo suscitou interesse no mundo da investigação, uma vez que no útero ocorrem fenómenos importantes e de interesse científico como é o caso da gravidez. Assim, em 1982, Casslén e col. estudaram a variação cíclica dos componentes celulares no fluido uterino humano e concluiu que células glandulares endometriais e células mononucleares fagocíticas eram as predominantes nas diferentes fases do ciclo menstrual. Igualmente presentes, mas em menor número estavam os granulócitos e os mastócitos. Todos os tipos de células supracitados estavam presentes em menor número na fase lútea, em comparação com as outras fases. Para além da redução de células, a fase lútea apresentava baixa atividade fagocítica, o que se compreendeu ser de extrema importância para que os blastocistos possam sobreviver, implantar-se no endométrio e para que a gravidez aconteça.<sup>(7)</sup>

As investigações continuaram, mostrando que o controlo da função endometrial envolve interações complexas entre os sistemas endócrino e imunológico, constituindo um processo fisiológico inflamatório cíclico.<sup>(3)</sup> Hoje sabe-se que as infeções perturbam a implantação e a menstruação, com consequências na saúde e fertilidade das mulheres. Assim o controlo inicial das infeções microbianas do trato genital feminino superior é importante e depende sobretudo da imunidade inata. O endométrio é defendido de diversas formas dos microrganismos patogénicos: por barreiras físicas e peptídeos antimicrobianos, pelo sistema do complemento, assim como por TLRs e de reconhecimento de padrão.<sup>(4)</sup>

A proteção do sistema imune efetuada nos diversos locais do trato genital feminino superior através de diversas células habitualmente envolvidas em processos inflamatórios ocorre através da produção de quimiocinas e citocinas. Estas ativam e recrutam células imunitárias, agentes bactericidas e virucidas, nos momentos em que a imunidade adaptativa é infra regulada por hormonas sexuais, para que a conceção possa ocorrer.<sup>(16)</sup>

De facto, toda a carga celular endometrial trabalha no sentido de proteger a principal função do endométrio, que é permitir a nidadação e suportar a gravidez.<sup>(12)</sup>

Também as hormonas produzidas nos ovários influenciam os diversos tipos celulares presentes no endométrio, induzindo a produção de fatores imunitários, com a finalidade de o proteger de infeções e prepará-lo para a implantação do embrião ou para a menstruação, e neste caso, também posteriormente para a sua reconstituição.<sup>(3)</sup>

Da mesma forma que o endométrio sofre alterações ao longo do ciclo menstrual, a quantidade, a qualidade, a função, assim como a ativação das células presentes no fluido uterino varia com o objetivo de permitir a conceção e simultaneamente evitar a desregulação dos processos biológicos que permitem a reprodução.

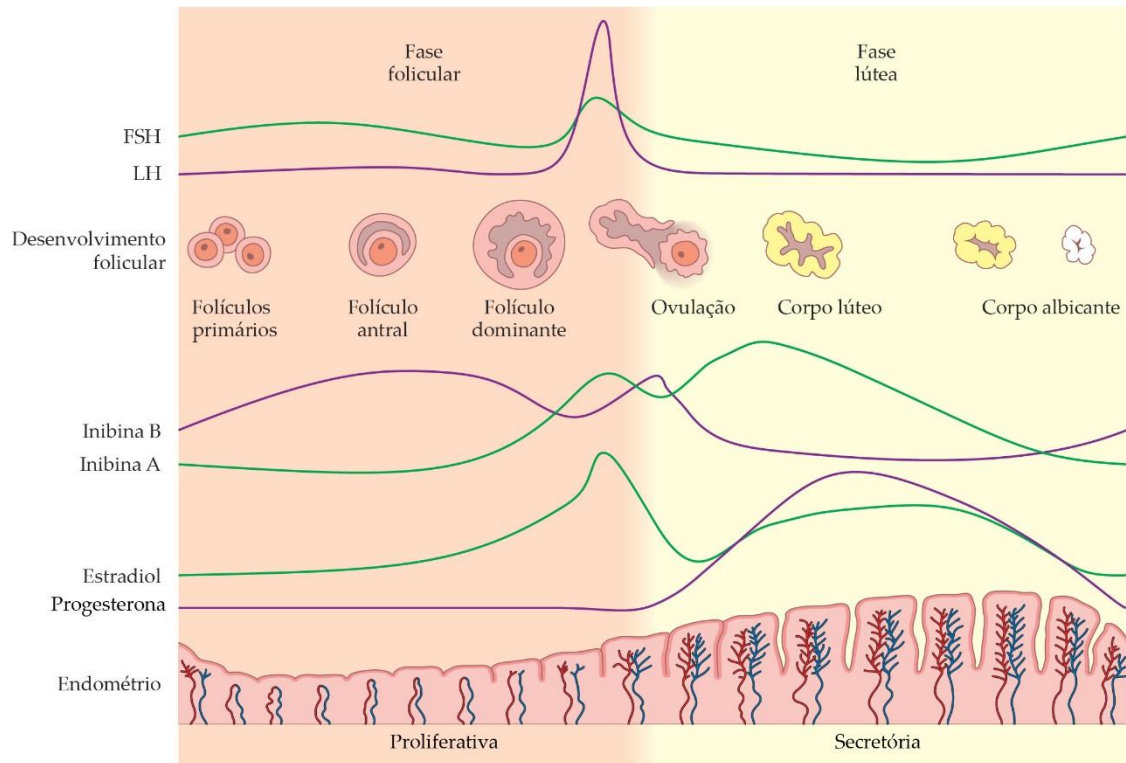


Figura 1 - Ciclo Menstrual (extraído de <http://www.medicinanet.com.br>).

Durante a fase secretora do ciclo menstrual, a secreção glandular aumenta por influência de mediadores (citocinas e fatores de crescimento), que modulam o endométrio e suportam a nidadação.<sup>(1)</sup>

Descobriu-se que qualquer tipo de lesão do endométrio aumenta a receptividade uterina à nidadação pela provocação inflamatória consequente. É interessante notar que a lesão inflamatória derivada de biópsia endometrial pode gerar uma acumulação focal uterina de células dendríticas que, por sua vez, aumentam a expressão endometrial de moléculas essenciais, que facilitam a interação entre o epitélio e o embrião.<sup>(5,8)</sup>

Posto isto, a transição para um útero receptivo à gravidez inclui mudanças celulares no endométrio, assim como modulação da expressão de diferentes citocinas, fatores de crescimento ou de transcrição e prostaglandinas, ou seja, implica o estabelecimento de um processo inflamatório seguido de recrutamento de células imunitárias. Assim se explica que induzir um ferimento, como o numa biópsia, provoca uma reação inflamatória, com aumento da possibilidade de estabelecimento de gravidez,<sup>(15)</sup> o que parece paradoxal.

Na dismenorreia primária, que é extremamente prevalente em mulheres jovens, o estudo da expressão do padrão genético concluiu existir desregulação da resposta inflamatória.<sup>(11)</sup> Ou seja, processos inflamatórios desregulados têm impacto nos períodos menstruais, provocando sangramento excessivo, assim como menstruações muito dolorosas. A disfunção do processo

inflamatório fisiológico do endométrio está igualmente presente em casos de endometriose e de fibromiomas submucosos.<sup>(3)</sup>

Ou seja, quando a resposta inflamatória é deficiente, surgem problemas de fertilidade, entre outros distúrbios, como dismenorreia.

Dentro dos muitos tipos celulares que estão envolvidos no processo inflamatório endometrial, cuja presença e importância se foram descobrindo ao longo das últimas décadas, estão os macrófagos, os mastócitos e os eosinófilos.

A figura 2 representa a linhagem mieloide, onde se pode verificar que as células acima referidas derivam dum mesmo precursor.

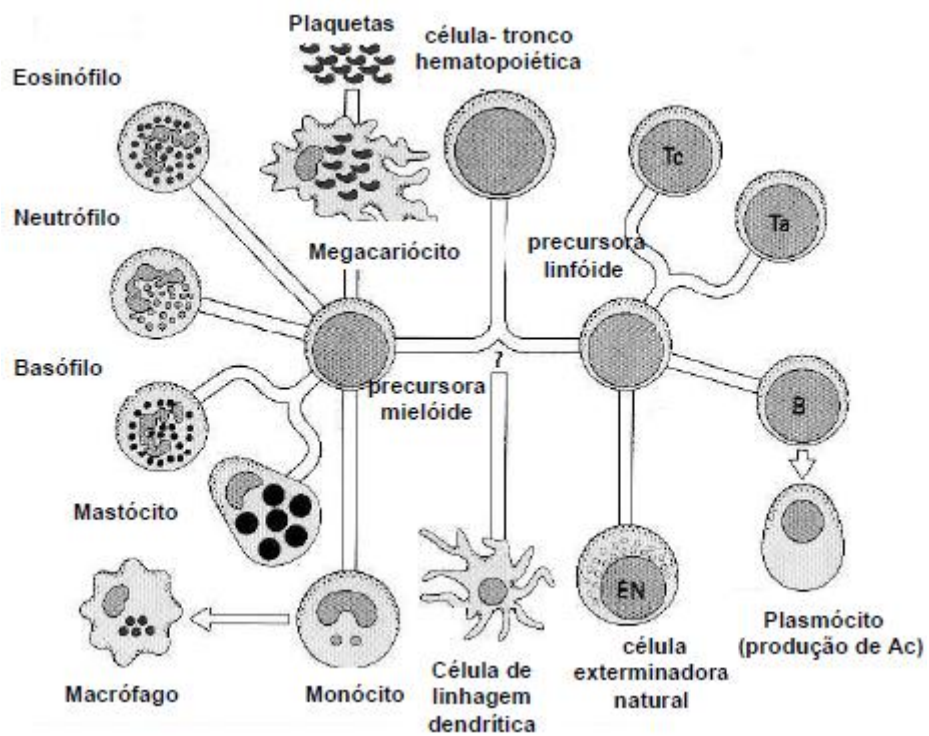


Figura 2 - Linhagem mieloide (www.4shared.com)

Os macrófagos presentes no endométrio têm um papel importantíssimo na manutenção das condições ideais à gravidez, e logo após essa conclusão desenvolveram-se diversos estudos no sentido de se conhecer como é regulada a sua atividade.<sup>(14)</sup> Foram identificados maioritariamente na fase secretora do ciclo menstrual, o que sugere que estas células possam ter um papel na fisiologia menstrual.<sup>(29)</sup> A rápida acumulação de macrófagos (CD163+) ocorre no estroma superficial após o 22º dia do ciclo, enquanto um número significativo de casos apresenta macrófagos simples ou agrupados dentro dos lumens glandulares do endométrio superficial na fase lútea, especialmente após o 20º dia do ciclo. O significado desta variação

não é claro, mas pode estar relacionado com uma resposta de macrófagos para a secreção glandular anormal ou sangramento que ocorrem na altura da ovulação.<sup>(31)</sup>

Dun E.C. e col (2013) realizaram um estudo com o objetivo de determinar se a distribuição de macrófagos ou a sua densidade diferia entre o endométrio normal, o endométrio com hiperplasia tipo I e tipo II e o endométrio com adenocarcinoma endometrial. A densidade de macrófagos foi significativamente maior em casos de hiperplasia, quer do tipo I, quer do tipo II do que no endométrio normal, e maior no adenocarcinoma. No entanto, a progressão do cancro não se relacionou significativamente com o número de macrófagos.<sup>(30)</sup>

Por sua vez Capobianco A. e col (2013) verificaram que os macrófagos são abundantes em lesões de endometriose, onde são recrutados e se submetem a ativação alternativa. Assim, os macrófagos detetam lesões e reagem, entregando sinais para restaurar a hemóstase local, a sua ação representa um passo necessário na história natural da doença. Talvez a endometriose também possa ser devida a uma falsa percepção de macrófagos no tecido endometrial ectópico.<sup>(32)</sup>

Os mastócitos, de forma geral, têm um papel sobretudo na reação alérgica, mas também na defesa contra organismos patogénicos. Não só estão presentes normalmente na cavidade uterina como elementos do processo inflamatório fisiológico endometrial, como também estão envolvidos na fisiopatologia das várias afeções do foro ginecológico.

A título de exemplo, e começando pela endometriose, que é uma doença ginecológica comum, que afeta a saúde física e mental da mulher de forma muito grave, porém cuja patogénese e mecanismo associado à dor continuam desconhecidos, estudos recentes mostraram que as fibras nervosas nas lesões endometriais podem libertar peptídios neurais como fator de crescimento e substância P que induzem os mastócitos a desgranular e libertar histamina, proteases, citocinas e quimiocinas que contribuem para o desenvolvimento da dor nas doentes com endometriose.<sup>(17)</sup>

Os mastócitos também têm sido apontados como importantes intervenientes na nidação, sendo que sua desgranulação provoca a libertação de fatores cruciais como a histamina, MMPs, triptase e VEGF que são conhecidos por serem envolvidos na invasão e posterior implante do embrião no útero.<sup>(21)</sup>

No que diz respeito à gravidez, sabe-se que os mastócitos estão presentes durante a implantação do blastocisto e apesar dos seus mediadores também poderem induzir a contratilidade do miométrio, não há evidência que estes possam estar envolvidos na ocorrência de partos pré termo. Se no início estão envolvidos favoravelmente pela libertação de histamina, em fases posteriores de gravidez, os macrófagos parecem ter já papel negativo, pois a sua ativação exacerbada, que não a sua simples presença, está associada com o parto pré termo.<sup>(19)</sup>

O número de mastócitos no útero tem sido observado a variar durante o ciclo menstrual, indicando uma influência hormonal sobre o seu recrutamento da periferia para o útero. Foi proposto, que o estradiol e a progesterona modulem a migração dos mastócitos para o útero e posteriormente a sua desgranulação, preparando assim o útero para a implantação.<sup>(21)</sup>

Sumariando: mastócitos são prevalentes no trato reprodutor feminino, no entanto, se os mastócitos são absolutamente necessários para uma gravidez com sucesso ou são fundamentais para a patologia de reprodução, e, assim, um alvo terapêutico, ainda está por descobrir.<sup>(18)</sup>

Os pólipos endometriais são lesões benignas frequentemente identificadas em mulheres inférteis ou com sangramento uterino anormal nas fases reprodutiva e na pós-menopausa. Al-Jefout e col. (2009) observaram que o número de mastócitos ativados que expressam triptase aumenta mais de sete vezes ao longo do ciclo menstrual, quando comparado com o endométrio normal.<sup>(20)</sup> Estes dados surpreendentes foram confirmados por Dekel e col. (2013) que concluíram serem os pólipos endometriais, lesões inflamatórias associadas a hiperatividade dos mastócitos.<sup>(8)</sup> Note-se que já tinham sido identificados mastócitos em leiomiomas uterinos.<sup>(23)</sup>

A angiogênese tumoral tem sido demonstrada em vários tipos de neoplasias. Entretanto, surgiram evidências de que os mastócitos podem produzir vários tipos de mediadores químicos com propriedades angiogênicas. No entanto, o papel específico de mastócitos no cancro do trato genital feminino ainda não foi bem compreendido. Por exemplo, num estudo que teve por objetivo determinar a correlação entre a densidade de mastócitos, a angiogênese tumoral, e os resultados clínicos em pacientes com adenocarcinoma do endométrio não mostrou haver relação entre a angiogênese e a densidade de mastócitos, a evolução clínica ou a recorrência do cancro.<sup>(22)</sup>

Quanto aos eosinófilos, Eidukaite A. e col. concluíram que a contagem de células CD 69+ é superior no fluido peritoneal de mulheres com endometriose. Os resultados indicaram que os eosinófilos são ativados precocemente, acumulam-se no fluido endometrial e assim podem desempenhar um papel significativo na patogênese da endometriose.<sup>(24)</sup> A presença abundante de eosinófilos desgranulados nas regiões fibrosas de endometriose apoia a interpretação de que participam na remodelação de tecidos e cicatrização de feridas.<sup>(25)</sup>

Em 2001, um grupo de investigadores identificou infiltrados de eosinófilos em leiomiomas, no entanto não foi encontrado qualquer significado clínico aparente.<sup>(26)</sup>

Foi ainda avaliada a presença e número de eosinófilos em estágios diferentes no corpo lúteo de 27 mulheres em idade reprodutiva. A camada granulosa em luteinização, a teca e antigos corpos hemorrágicos no antro continham baixo, moderado e elevado número de eosinófilos respetivamente. Ficou igualmente claro que os eosinófilos diminuem rapidamente durante a fase secretora.<sup>(27)</sup>

Pesquisa de células inflamatórias em aspirados endometriais e sua correlação em situações patológicas

Quanto aos granulócitos e células T citotóxicas, numa análise citológica de lesões de endometriose, estes não aparecem em número apreciável.<sup>(28)</sup>

Concluindo de forma breve e retendo uma ideia fundamental, a inflamação endometrial é fisiológica e está sempre presente com os elementos celulares necessários para este processo. A desregulação deste processo inflamatório relaciona-se com fenómenos patológicos.<sup>(3)</sup>

Estudos indiretos compararam proteínas obtidas com aspirados e com lavados endometriais, provenientes das mesmas mulheres.<sup>(9)</sup> Para o estudo proteico utilizaram três métodos:

- SELDI-TOF-MS;
- Doseamentos de ensaios citocinas multiplex;
- Mensuração da atividade pró-proteína convertase 6.

A composição obtida por lavagem e a do aspirado revelaram-se substancialmente diferentes. Embora houvessem muitas semelhanças nos perfis de proteínas totais e proteínas mais específicas detetadas em ambos os fluidos, estes não eram nem qualitativa nem quantitativamente comparáveis na mesma mulher, o que provavelmente se deve ao facto de a amostragem da aspiração ser mais local que a amostragem da lavagem da cavidade endometrial.<sup>(9)</sup>

O aspirado endometrial contém proteínas, glícidos, lípidos segregados pelas células endometriais, e fragmentos de tecido uterino se na fase secretora. Inclui ainda leucócitos, os quais são removidos através de lavagem e centrifugação suave antes da congelação, a menos que estes sejam diluídos e centrifugados imediatamente a seguir à sua recolha.<sup>(9)</sup>

Estas duas técnicas são minimamente invasivas quando comparadas com a biopsia endometrial, e as amostras obtidas ajudam na compreensão da fisiologia do útero e na deteção de doenças endometriais, o que se revela importante para o desenvolvimento de testes de diagnóstico com base em um ou mais componentes do fluido.<sup>(9)</sup>

Casado-Vela e col. catalogaram todas as proteínas presentes no fluido endometrial durante a fase secretora do ciclo menstrual.<sup>(2)</sup> Esta informação pode ser valiosa para o estudo da nidação e para, no futuro, descobrir um biomarcador envolvido nas alterações patológicas da função endometrial. Para esta análise foram utilizadas três estratégias complementares:

- HPLC - MS/MS;
- SDS - PAGE, seguida de análise de HPLC - MS/MS;
- 2D - PAGE seguida de análise MALDI - TOF/TOF.

Foram identificadas cerca de 803 proteínas diferentes, ficando a saber-se que o fluido endometrial difere, na sua composição proteica, de outros fluidos biológicos estudados até agora, como o cérvico-vaginal.<sup>(2)</sup>

A composição proteica do fluido endometrial durante a fase secretora, que é à partida a fase mais recetiva do ciclo menstrual, poderá indicar qual o perfil proteico do útero recetivo.

Por outro lado, o ambiente do aspirado vaginal é substancialmente diferente, uma vez que é um meio séptico, povoado por bactérias da flora vaginal.<sup>(2)</sup> As comunidades bacterianas na vagina humana estão adaptadas ao seu papel de defesa do hospedeiro contra doenças infecciosas, através da produção de ácido láctico, resultando num ambiente com pH baixo, que limita o crescimento de agentes patogénicos.<sup>(6)</sup>

Porém, tanto o endocolo e o endométrio como o exocolo e a vagina são considerados epitélios alvo de transmissão sexual de vírus como o HIV. O útero e o endocervix estão protegidos pelo muco cervical que contém moléculas imunitárias inatas antivirais que constituem uma barreira física, no entanto, o sémen de um portador de HIV contém espermatozoides que capturam o vírus HIV e transmitem-no às células dendríticas.<sup>(10)</sup>

As infecções do tracto genital inferior com *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Trichomonas vaginalis* estão associadas a aumentos na subpopulação endometrial de leucócitos, sendo a infeção com *C. trachomatis* a que provoca uma maior resposta inflamatória.<sup>(13)</sup>

## Sumário da revisão

Posto que a inflamação endometrial é fisiológica e está sempre presente para o normal funcionamento da cavidade uterina, e que o desregulamento desta atividade inflamatória está relacionado com situações patológicas, a análise de células inflamatórias obtidas de lavados endometriais (técnica minimamente invasiva e de fácil aplicabilidade), poderá constituir um excelente meio de avaliação da situação endometrial naquela mulher, (por ex.: células inflamatórias presentes no aspirado são compatíveis, quantitativa e qualitativamente, com situação fisiológica ou patológica).

À semelhança do que já foi feito para as proteínas, seria interessante catalogar as células inflamatórias, nomeadamente macrófagos, mastócitos, neutrófilos, e eventualmente, eosinófilos e basófilos nos lavados endometriais nas diversas fases do ciclo menstrual. Assim, poderia ser possível saber mais ao pormenor as variações destas, de acordo com a situação clínica da mulher.

Se tudo isto se pudesse catalogar e fossem encontradas correlações entre padrões de células com situações normais, (sem doença ou queixas), e com situações com patologia ou sintomatologia, poderia ser possível definir padrões que servissem de marcadores biológicos que pudessem diagnosticar e até ajudar no acompanhamento de patologias no trato genital feminino superior, através de uma técnica minimamente invasiva e inofensiva para as doentes.

## Objetivo do presente trabalho

O presente trabalho pretende identificar, de forma semi quantitativa, e através de uma metodologia simples e de baixo custo, as células inflamatórias referidas anteriormente (macrófagos, mastócitos e eosinófilos) e outras da mesma linhagem mieloide, nos lavados endometriais em diferentes situações fisiológicas e/ou patológicas nos vários grupos etários da mulher.

Com o conhecimento de perfis específicos de células inflamatórias compatíveis com diferentes situações clínicas, poder-se-ão definir padrões de marcadores biológicos que permitam melhor caracterizar determinadas patologias.

Assim, elaboramos as seguintes hipóteses:

- É possível utilizar material fixado para estudo das células do fluido endometrial.
- A coloração de May Grunwald-Giemsa é aplicável ao estudo das células da cavidade uterina.
- A partir da visualização das lâminas ao microscópio ótico é possível encontrar mastócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células epiteliais.
- Identifica-se uma relação entre o perfil celular do fluido endometrial e a situação clínica subjacente.

## **Material 1: senhoras a incluir**

Foram incluídas no estudo mulheres em idade fértil ou pós-menopáusicas, com indicação de histeroscopia por queixas do foro ginecológico, e que aceitaram participar através do consentimento informado.

## **Material 2: amostras, armazenamento, tratamento e avaliação ao microscópio ótico**

Foram sistematicamente cumpridos os passos seguintes:

- 1- Obter consentimento informado de cada utente que vai ser submetida a uma histeroscopia;
- 2- O histeroscópio é introduzido no útero pelo canal cervical até à visualização da cavidade uterina. Utilizando o próprio sistema de irrigação do histeroscópio, “faz-se um lavado” endometrial, com solução salina estéril, e dessa solução serão aspirados outros 5mL que serão fixados com etanol 50%, em partes iguais;
- 3- A amostra é armazenada em ambiente refrigerado;
- 4- Posteriormente é centrifugada, durante cerca de 5 minutos, a 1500 rotações por minuto, depois de colocados cerca de 3mL de cada uma das 30 amostras no cytospin;
- 5- As células são posteriormente recolhidas e projetadas em lâminas de vidro e coradas de May Grünwald e Giemsa;
- 6- As lâminas são visualizadas ao microscópio ótico para identificação e classificação semi-quantitativa de mastócitos, macrófagos e eosinófilos em ausentes, raros, frequentes ou muito frequentes;
- 7- Correlacionar com quadro clínico de cada uma das 32 mulheres das quais se obtiveram lavados endometriais.

## Resultado esperado

A partir da visualização das lâminas espero encontrar principalmente mastócitos, macrófagos e eosinófilos. Está descrito na literatura que estas células estão presentes em situações normais no trato reprodutor feminino e que quase sempre se encontram aumentadas em distúrbios que fazem parte das patologias descritas nas mulheres da minha amostra.

É de esperar que outros tipos celulares possam ser encontrados, como neutrófilos e basófilos, uma vez que fazem parte da linhagem mieloide, e claro, células epiteliais decorrentes do epitélio endometrial.

## Resultados

Foram recolhidos, no total, 32 lavados endometriais, apesar de 34 mulheres terem aceitado participar no estudo, 2 delas não toleraram a introdução do histeroscópio, uma vez que o exame é feito sem anestesia.

Essas 32 mulheres que tinham indicação para realizar histeroscopia apresentavam-se com uma ou mais das seguintes situações clínicas: pólipos endometriais, metrorragias, infertilidade, mioma uterino, septo uterino, sinéquias, adenomiose e/ou atrofia quística do endométrio. Em 2 mulheres o exame demonstrou que os diagnósticos suspeitos não se confirmaram. Uma mulher tinha como diagnóstico suspeito mioma uterino e a outra pólipo endometrial. Estas mulheres acabaram por se transformar num grupo sem patologia/ grupo normal, sem que com isso se levantasse alguma questão ética, pois apesar dos diagnósticos não se confirmarem, tinham indicação para a realização do exame.

Das 32 mulheres onde foi possível visualização direta da cavidade uterina através do histeroscópio 15 tinham pólipos endometriais; 5 sofriam de metrorragias; 6 vinham com diagnóstico de infertilidade; 5 tinham miomas uterinos; 1 tinha adenomiose; 1 atrofia quística do endométrio; 1 apresentava sinéquias e 1 tinha septo uterino.

Com a visualização ao microscópio foi possível semi quantificar as células de interesse, tendo em conta a sua presença e frequência, e no final, correlacionar com a clínica das doentes a que correspondia cada amostra. Para este processo, foi elaborado um código onde cada número de processo correspondia a um número de 1 a 34, de forma a garantir confidencialidade no decorrer do processo de análise e processamento de dados.

As células semi quantificadas pertencem a 6 grupos. Macrófagos, mastócitos e eosinófilos, que foram de início as células de interesse da pesquisa bibliográfica deste trabalho, às quais se juntaram os neutrófilos e os basófilos, uma vez que estavam presentes em grande parte das amostras e derivam da mesma célula precursora mieloide. As células epiteliais acabaram também por ser semi quantificadas sobretudo devido à sua enorme frequência em comparação com os restantes elementos celulares.

A observação microscópica foi registada com fotografias, onde se podem ver células de interesse neste trabalho.

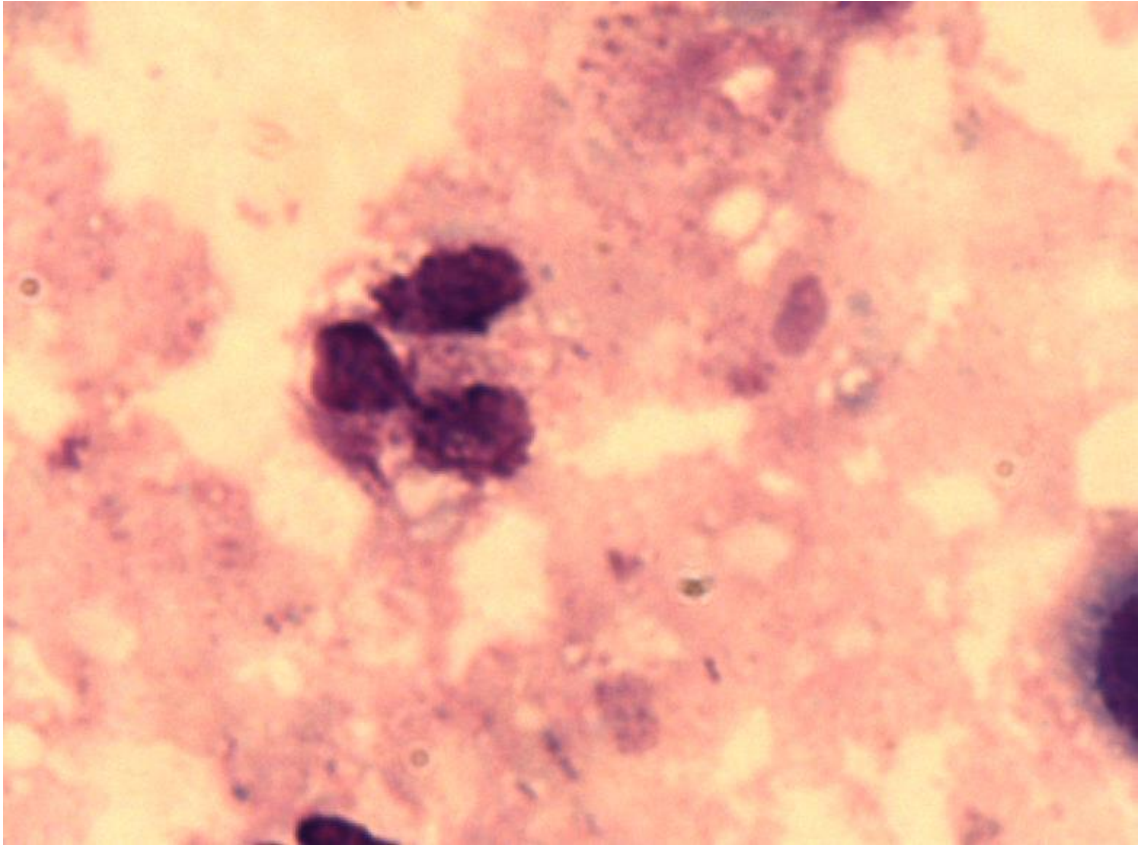


Figura 3 - Neutrófilo visualizado ao microscópio ótico, na ampliação x100.

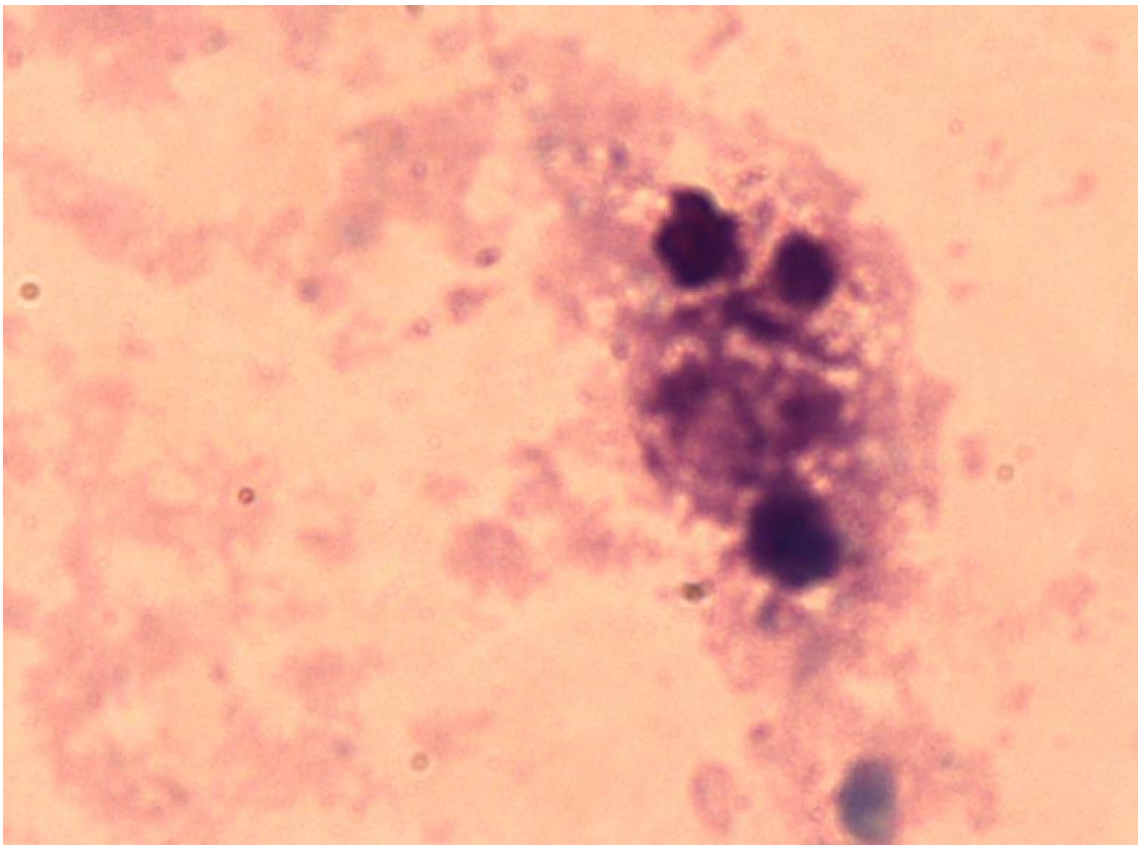


Figura 4 - Macrófago visualizado ao microscópio ótico, na ampliação x100.

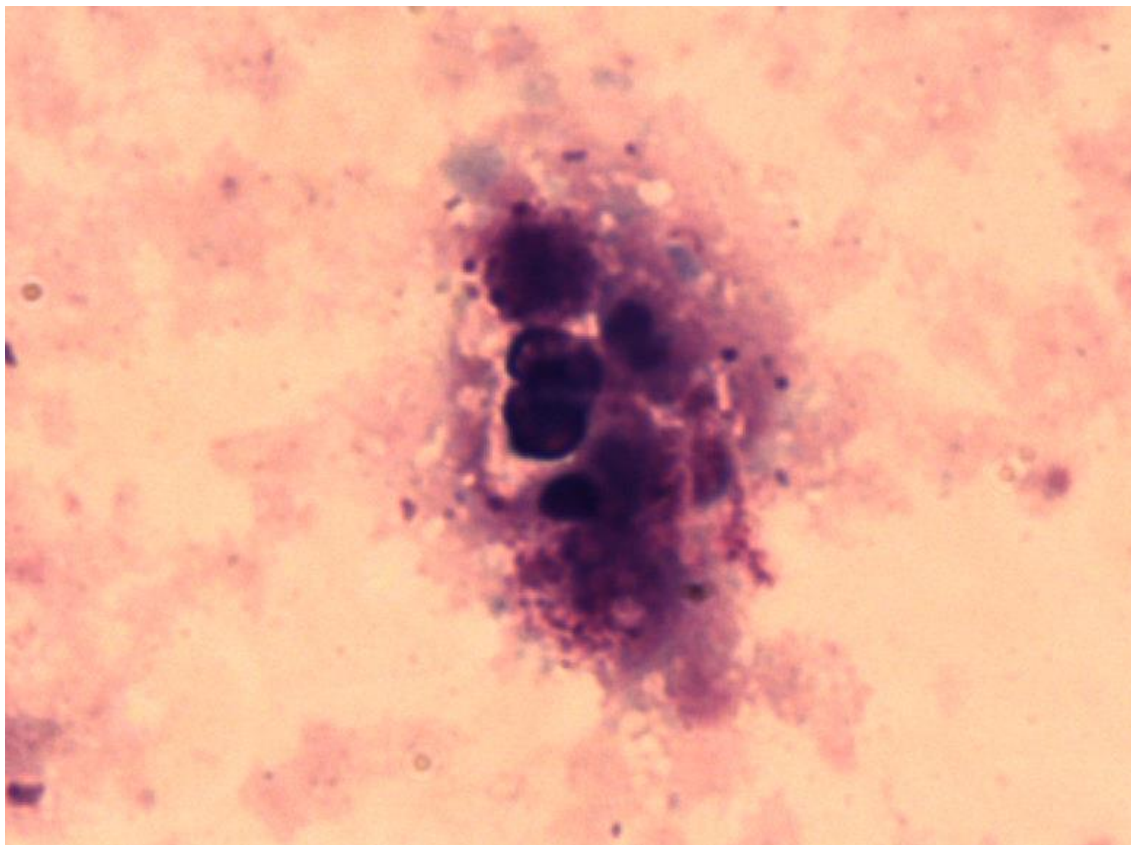


Figura 5 - Macrófago visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.

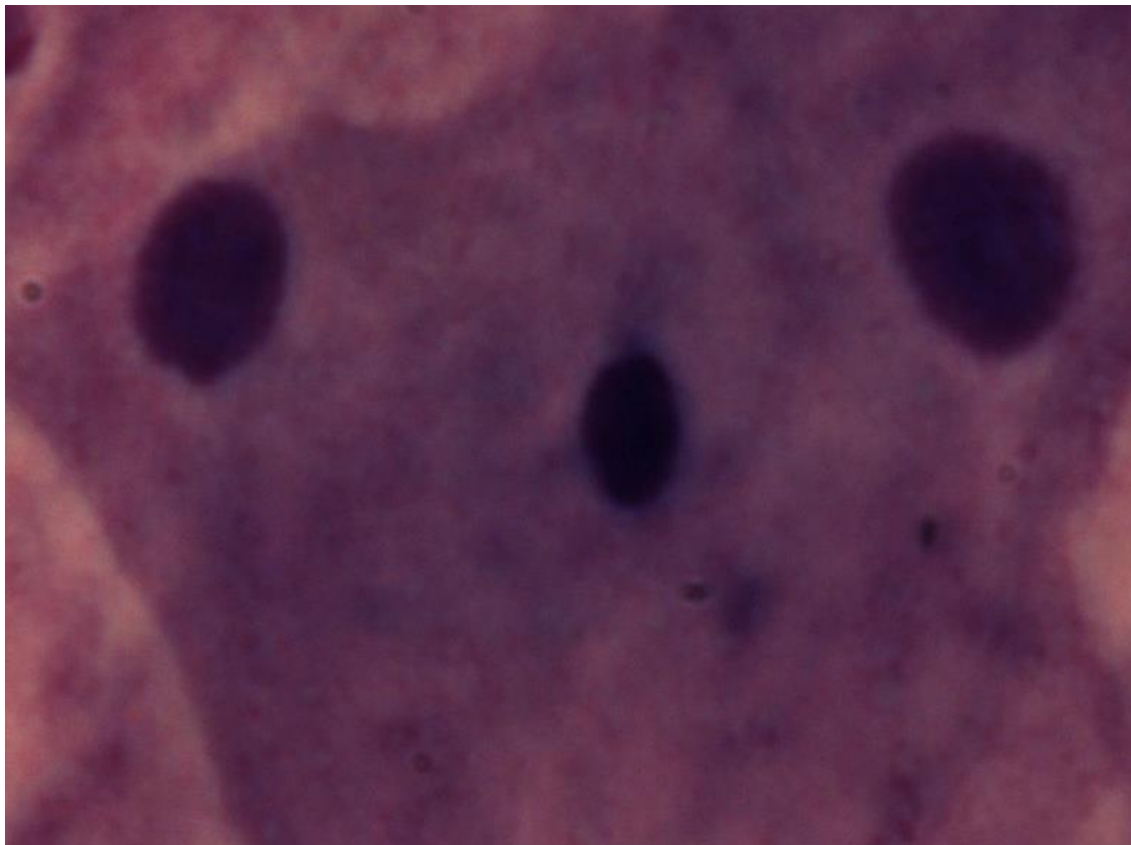


Figura 6 - Células epiteliais visualizadas ao microscópio ótico na ampliação x100.

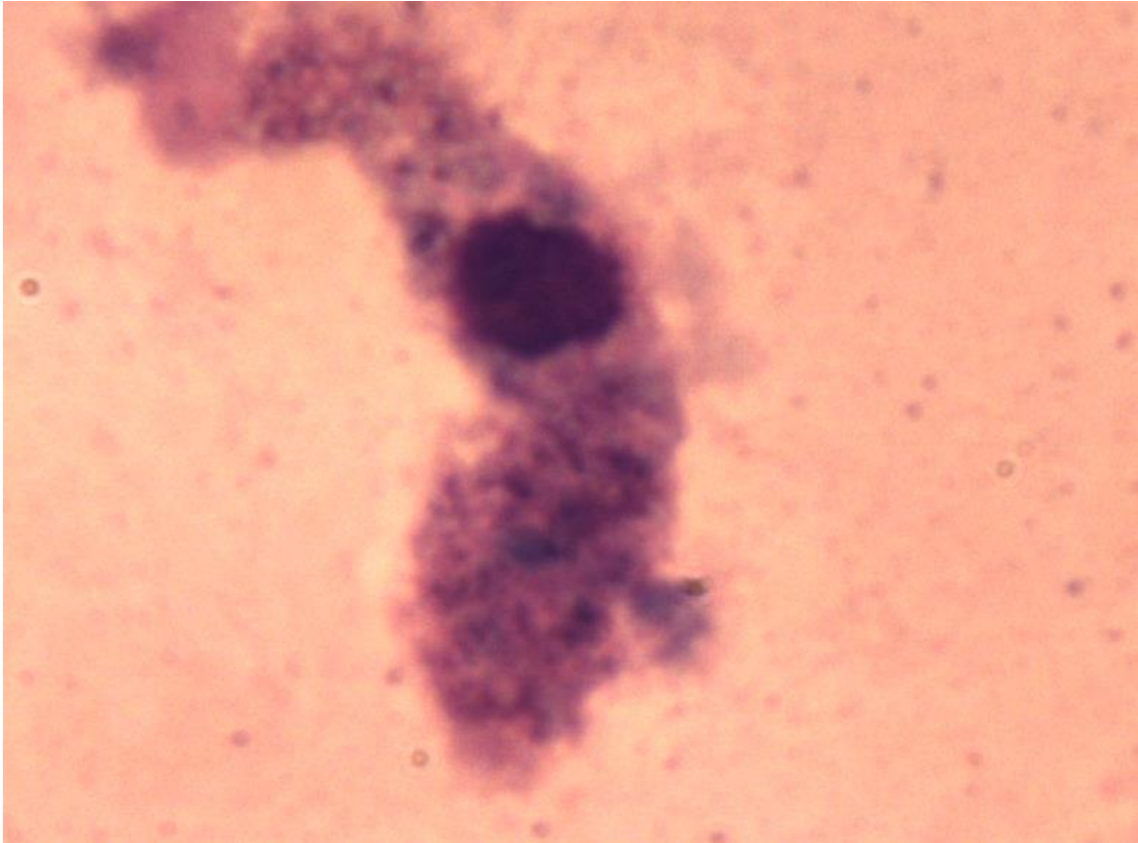


Figura 7 - Mastócito visualizado ao microscópio ótico na ampliação x100.

As 32 mulheres das quais se obteve amostra têm idades compreendidas entre os 32 e os 81 anos, e a sua distribuição por grupos etários pode ser apresentada da forma seguinte:

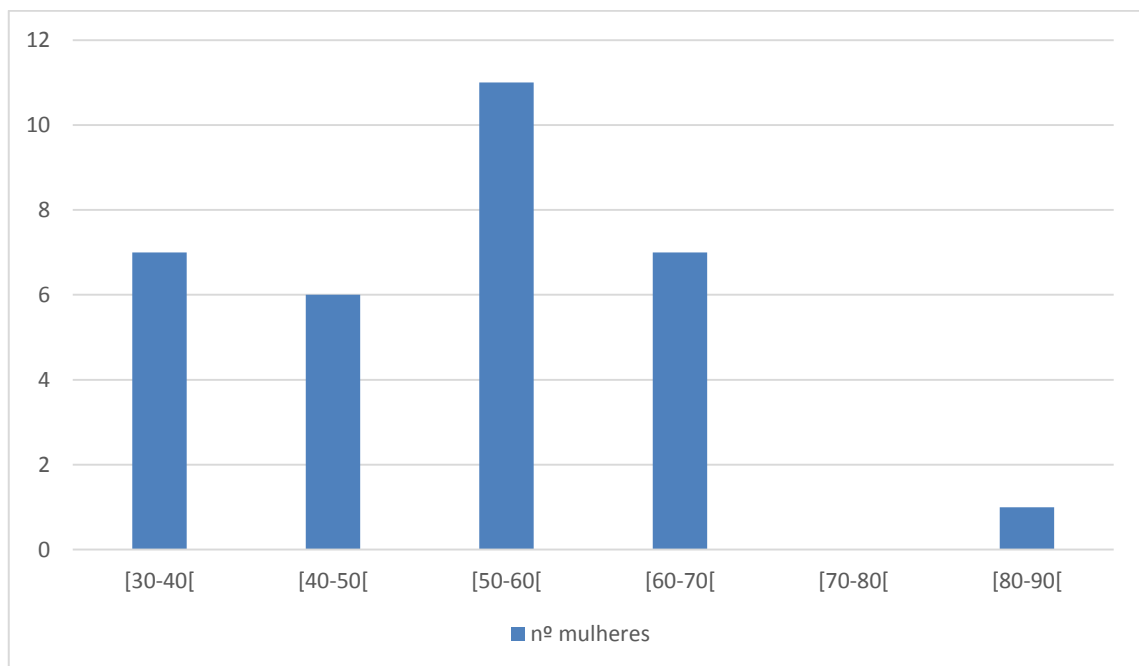


Gráfico 1 - Mulheres que constituem a amostra por faixa etária.

Os resultados da avaliação do tipo e quantidade das células inflamatórias presentes estão expressos no gráfico 2.

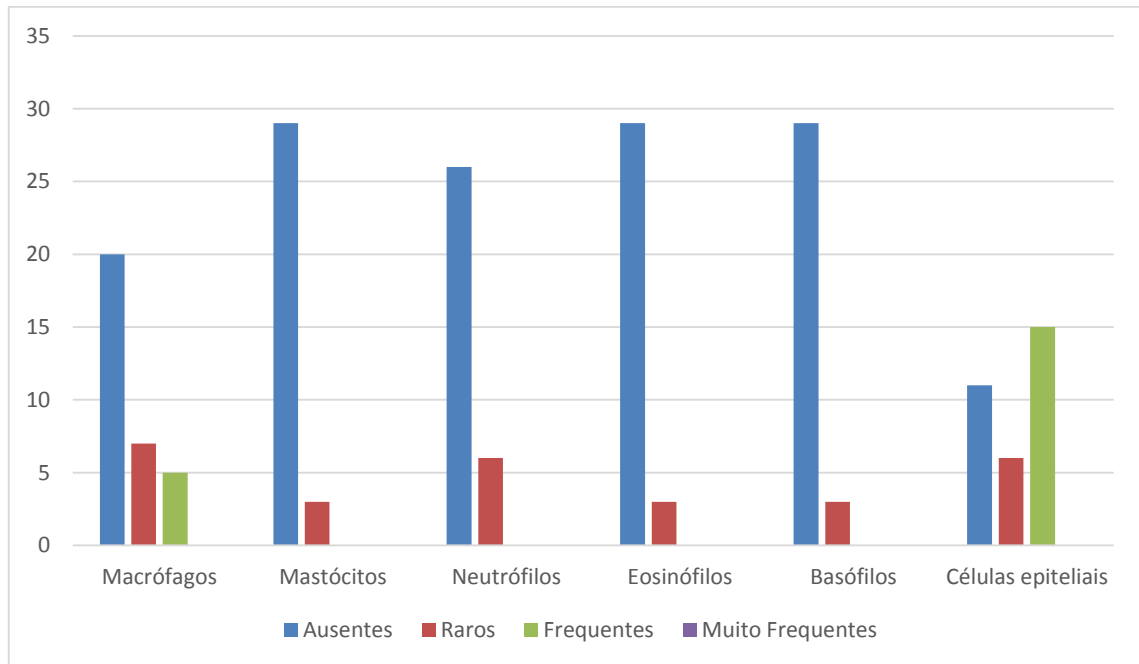


Gráfico 2 - Análise semi quantitativa dos elementos celulares presentes nas amostras, onde se relaciona cada tipo celular com a frequência (raros, frequentes ou muito frequentes) ou ausência que surgem nas 32 amostras.

Nenhum elemento celular foi encontrado muito frequentemente em qualquer amostra. As células epiteliais lideram a lista das mais prevalentes, seguidas dos macrófagos.

Das 32 amostras recolhidas, em 6 não foi possível detetar qualquer tipo de elemento celular. Essas amostras pertenciam a mulheres com pólipos endometriais, metrorragias, miomas uterinos, sinéquias e atrofia quística do endométrio.

Analisando os resultados de outra forma, e tendo em conta as situações clínicas das doentes que constituem a amostra em estudo, as células têm as seguintes distribuições apresentadas nos gráficos seguintes:

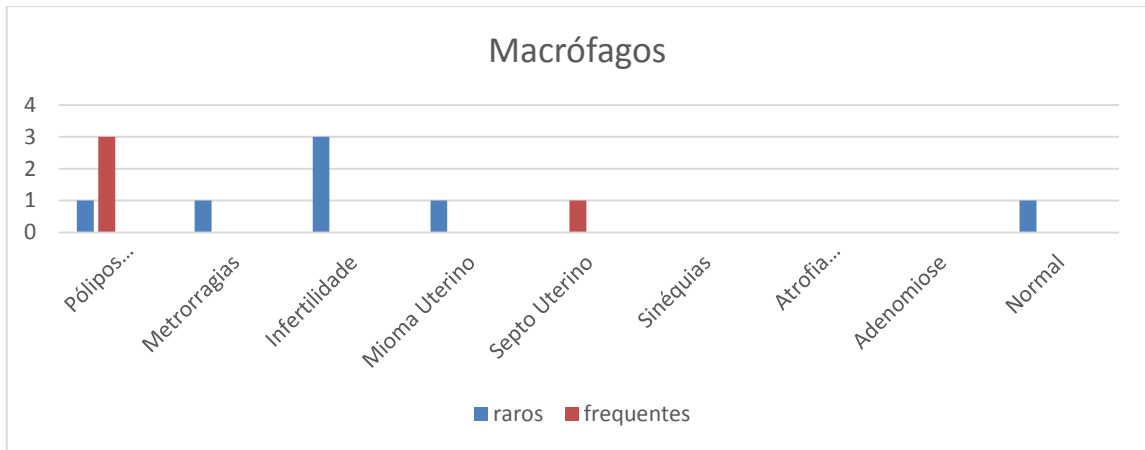


Gráfico 3 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de macrófagos.

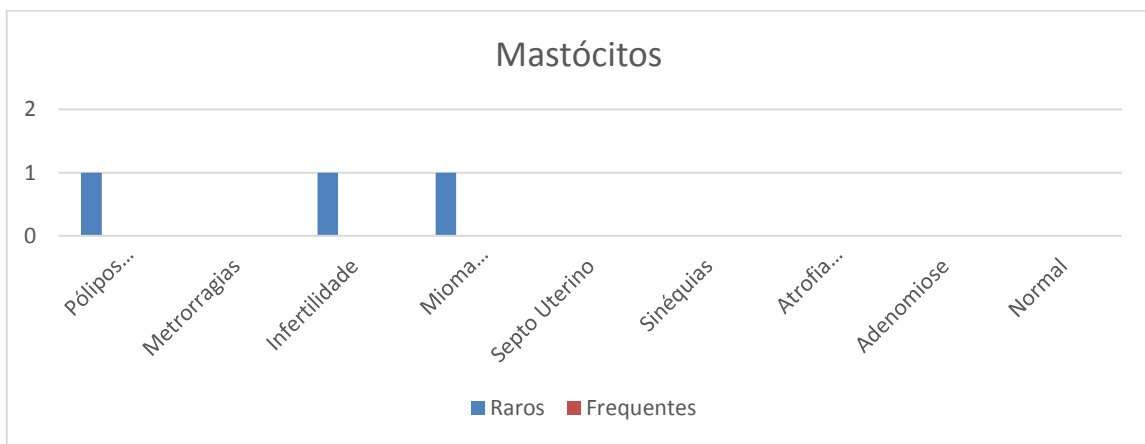


Gráfico 4 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de mastócitos.

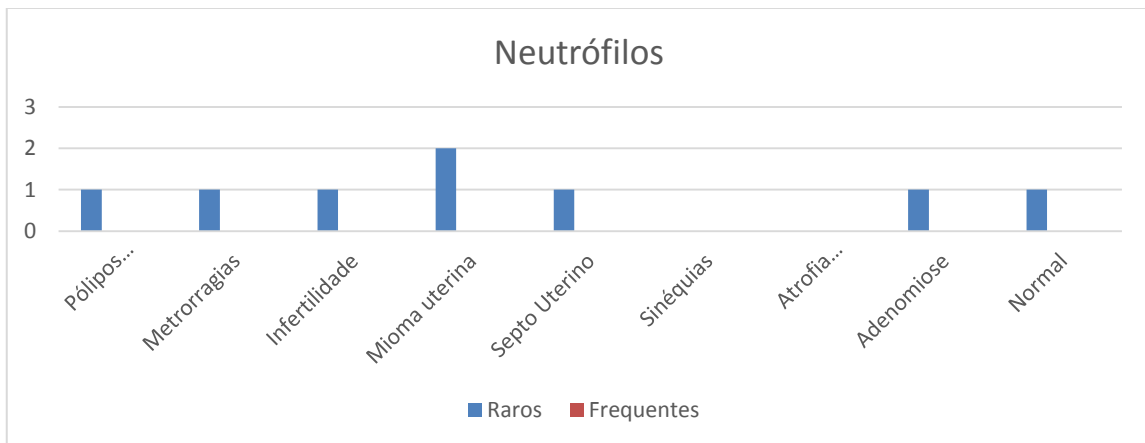


Gráfico 5 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de neutrófilos.

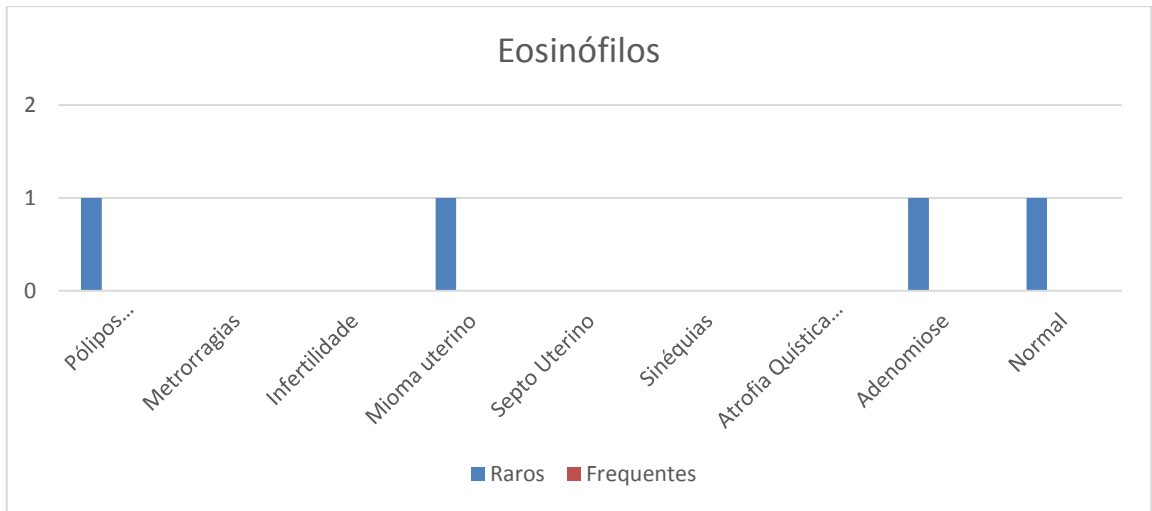


Gráfico 6 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de eosinófilos.

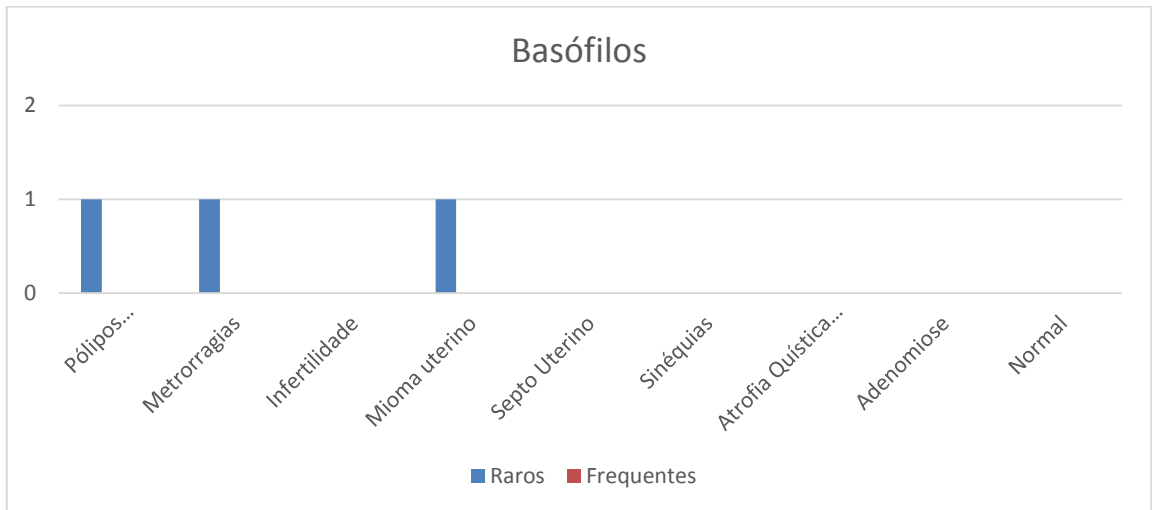


Gráfico 7 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de basófilos.

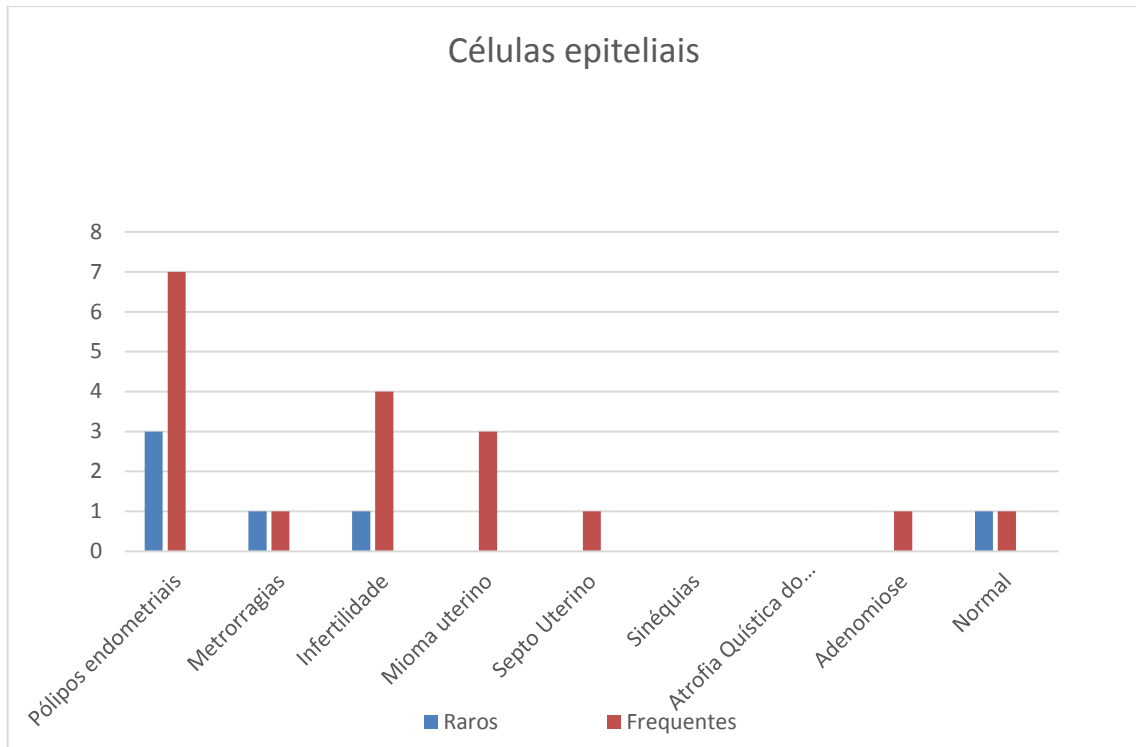


Gráfico 8 - Semi quantificação (raros ou frequentes) de células epiteliais.

Do exposto pode-se concluir que:

- As células das amostras dos casos de sinéquias e de atrofia quística do endométrio não eram identificáveis o que pode ser consequência de terem sido destruídas ou de serem os lavados acelulares.
- Os macrófagos estão presentes em maior quantidade em casos de pólipos endometriais, já menos em casos de infertilidade.
- Os mastócitos foram raramente identificados em situações clínicas de pólipos uterinos, infertilidade e miomas uterinos.
- Os neutrófilos estão presentes sobretudo em casos de miomas uterinos.
- Eosinófilos presentes de forma rara em casos de pólipos endometriais, miomas uterinos, adenomiiose e nos casos sem patologia/normal.
- Os basófilos foram identificados, de forma rara, nos casos de pólipos endometriais, metrorragias e miomas uterinos.
- As células epiteliais foram os elementos celulares mais extensamente identificados em todas as amostras em estudo, sobretudo em casos de pólipos endometriais, infertilidade e miomas uterinos.

Como seria de esperar, as situações clínicas variam de acordo com a idade. O gráfico abaixo representado indica a prevalência de cada situação clínica na faixa etária indicada.

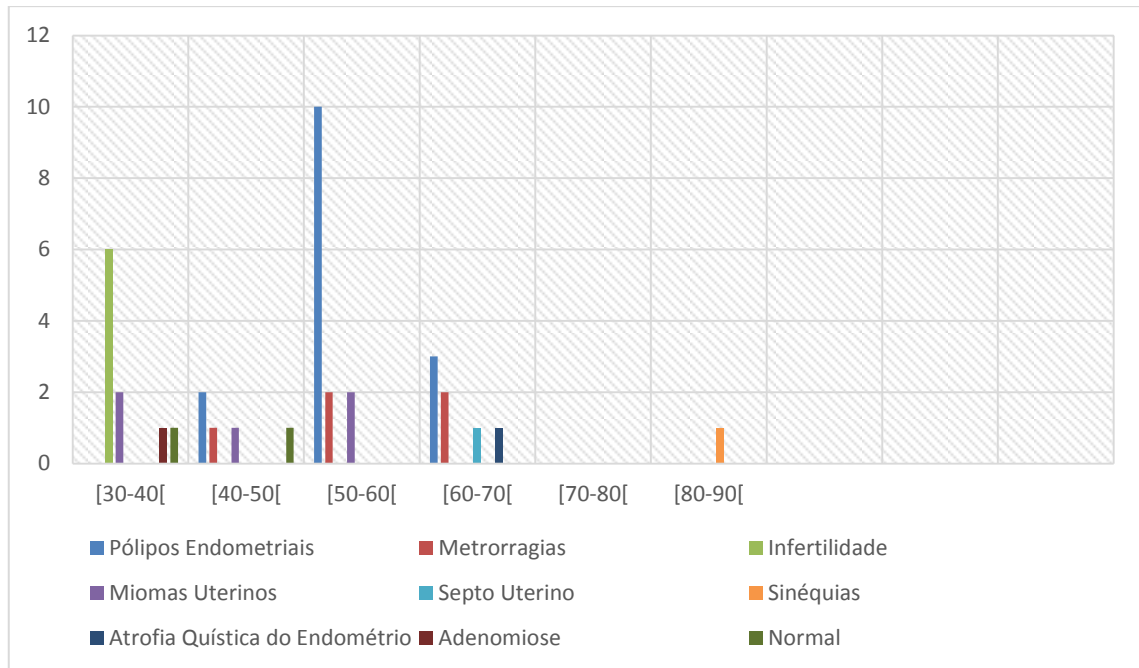


Gráfico 9 - Situações clínicas das mulheres da amostra de acordo com as suas idades.

Assim, na amostra em estudo, a infertilidade domina as situações clínicas na faixa dos 30 aos 40 anos. Já na faixa dos 40 aos 50 anos são os pólipos endometriais mais frequentes e sobretudo na faixa etária dos 50 aos 60 anos. Na faixa etária dos 60 aos 70 anos os pólipos endometriais também predominam. A amostra não engloba mulheres com idades compreendidas entre os 70 e os 80 anos.

Também pode correlacionar-se a idade das mulheres da amostra com as células encontradas nos seus lavados endometriais.

Tabela 1 - Distribuição dos diferentes tipos celulares nas várias amostras, de acordo com a faixa etária da mulher de onde se recolheu o lavado endometrial.

Faixa Etária \ Células	Macrófagos	Mastócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Células epiteliais
30-40	3	1	3	2	0	6
40-50	3	0	0	0	1	4
50-60	4	1	1	0	2	7
60-70	1	0	1	1	0	4
70-80	0	0	0	0	0	0
80-90	0	0	0	0	0	5

De acordo com a tabela, as células epiteliais predominam de forma transversal em todas as faixas etárias.

Os macrófagos são mais frequentes em idades compreendidas entre os 30 e os 60 anos.

Neutrófilos e eosinófilos são mais frequentes na faixa etária dos 30 aos 40 anos.

## Discussão

Aceitaram participar no estudo 34 mulheres, todas com indicação para realizar histeroscopia, sendo que a participação não mudava o desconforto produzido pelo exame nem deixava a doente exposta a qualquer risco adicional. Destas, 32 mulheres toleraram a realização completa do exame, com introdução do histeroscópio na cavidade uterina e consequente recolha do lavado endometrial pretendido.

Dessas 32 amostras recolhidas, 6 encontravam-se em mau estado de conservação aquando da realização da análise ao microscópio ótico, e por isso, não foi possível visualizar nem quantificar elementos celulares nessas amostras. As amostras que se encontravam degradadas pertenciam a mulheres com diferentes situações clínicas, e das 9 situações clínicas que constituíam a amostra em estudo, mulheres com pólipos endometriais, metrorragias, sinéquias, miomas uterinos e atrofia quística do endométrio originaram amostras que se degradaram.

Apesar das restantes 26 amostras conterem baixa carga celular, foram semi quantificados 6 tipos celulares em ausentes, raros, frequentes e muito frequentes, através da visualização ao microscópio ótico. Inicialmente o estudo previa semi quantificar apenas macrófagos, mastócitos e eosinófilos. No entanto, e tendo em conta a sua presença e por pertencerem à mesma linhagem mieloide, foram também contabilizados mais 2 tipos celulares, os neutrófilos e os basófilos.

As células epiteliais eram, de facto, os elementos celulares mais abundantes em quase todas as amostras disponíveis, facto que justificou a sua incorporação aos resultados.

Depois da análise, foi possível verificar que nenhum elemento celular se encontrava muito frequentemente, em qualquer amostra, devido à sua grande diluição. Isto implicou que nenhum tipo celular fosse semi quantificado como muito frequente, e que todos os elementos celulares em estudo estivessem maioritariamente ausentes, exceto as células epiteliais.

De facto, as células epiteliais foram os elementos mais frequentemente identificados, seguidas dos macrófagos.

Os macrófagos encontraram-se mais abundantemente em casos de pólipos endometriais, e em seguida em casos de infertilidade.

Os mastócitos não foram visualizados em muitas amostras. Apenas identificados raramente em casos de pólipos endometriais, infertilidade e miomas uterinos.

Já os neutrófilos estavam presentes sobretudo em casos de miomas uterinos.

Raros eosinófilos foram identificados na presença de pólipos endometriais, em casos de miomas uterinos, adenomiose e no grupo sem patologia.

Finalmente, os basófilos foram identificados em três situações clínicas: nos pólipos endometriais, nos casos de metrorragias e nos miomas uterinos.

As situações clínicas das mulheres da amostra variam de acordo com a sua idade. Depois de uma breve análise, pode-se concluir que a amostra em estudo coloca casos de infertilidade sobretudo na faixa dos 30 aos 40 anos e pólipos endometriais nas faixas etárias 40-50, 50-60 e 60-70 anos. Estes resultados estão de acordo com a idade típica conhecida de cada uma dessas situações.

Outra análise a fazer, tendo em conta a idade das mulheres da amostra é que as células epiteliais estão presentes quase de igual forma em todas as faixas etárias. Os macrófagos foram identificados sobretudo nas idades compreendidas entre os 30 e os 60 anos. Já os neutrófilos e eosinófilos estavam presentes sobretudo na faixa etária dos 30 aos 40 anos.

De acordo com estes resultados, concluiu-se ser possível através da fixação com álcool a 50%, centrifugação e posterior coloração com May Grunwald Giemsa, identificar macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células epiteliais, nas amostras recolhidas do lavado endometrial, apesar de algumas amostras se terem degradado devido à fixação.

Tendo em conta essa degradação, procurou-se uma alternativa ao estudo a partir de amostras a fresco, sem qualquer tipo de fixação e/ou refrigeração, de forma a impedir a sua degradação e conseqüente perda de elementos celulares, no entanto este procedimento é inconveniente por ter de ser imediato.

Devido à grande diluição, as amostras contêm uma pequena quantidade de células, o que em parte já era esperado, tendo em conta que ao lavado endometrial realizado é acrescentada igual quantidade de fixador (fixador e lavado endometrial em partes iguais). Também o tamanho da amostra acabou por ser limitante no que toca ao estabelecimento de uma relação entre os tipos celulares encontrados e as situações clínicas das mulheres a que correspondem. A amostra deveria ser muito maior e menos heterogénea, ou pelo menos com grupos bem definidos de patologias, com um maior número de casos em cada situação clínica.

Assim, é importante reparar que três das hipóteses colocadas foram totalmente confirmadas, ou seja:

- É possível utilizar material fixado para estudo das células do fluido endometrial.
- A coloração de May Grunwald Giemsa é aplicável ao estudo das células colhidas da cavidade uterina.
- A partir da visualização das lâminas ao microscópio ótico é possível encontrar mastócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células epiteliais.

A última hipótese colocada (Identifica-se uma relação entre o perfil celular do fluido endometrial e a situação clínica subjacente) terá de ser interpretada com maior cautela, no sentido de que os resultados obtidos teriam de ser verificados numa amostra mais ampla. No entanto, os resultados deste trabalho não contradizem a hipótese de que poderá a partir desta metodologia ser estabelecida uma relação.

Em suma todos estes resultados estão de acordo com os dados recolhidos na pesquisa bibliográfica, o que significa que à parte das limitações, este método identificou as células que se pretendiam, nas situações clínicas relatadas. É óbvio que uma amostra maior e algumas alterações na metodologia, certamente poderiam beneficiar os resultados, para que a exatidão fosse maior e até novas informações pudessem ser retiradas do estudo.

## Limitações do estudo

Numa investigação clínica, muitas vezes nem tudo corre como planeado, existem intercorrências que modificam o resultado esperado, e situações inesperadas acontecem. No entanto, a própria dificuldade do processo deve ser transformado em conhecimento, de modo a que nenhuma informação produzida seja perdida. Neste contexto, apresentam-se as limitações identificadas ao nível da amostra, armazenamento e análise, ao longo do desenvolvimento deste trabalho de investigação.

**Amostra reduzida** - Devido à limitação de tempo de desenvolvimento deste trabalho, foram recolhidos lavados endometriais a 32 doentes. Durante o período em análise verificaram-se muitas intercorrências, como prolongado tempo de avaria do equipamento endoscópico, períodos de suspensão da atividade cirúrgica, erros variados na preparação e transporte das amostras até ao laboratório.

**Amostra heterogénea** - as 32 mulheres às quais foi possível recolher lavados endometriais tinham idades compreendidas entre os 32 e os 81 anos, 9 situações clínicas diferentes (pólipo endometrial, metrorragias, infertilidade, mioma uterino, septo uterino, sinéquias, atrofia quística do endométrio, adenomiose, normal/sem patologia). Muito embora diversifiquem demasiado a amostra em relação à sua dimensão estas variáveis podem, porém, constituir também uma vantagem.

**Armazenamento da amostra** - as amostras foram fixadas em álcool a 50%, em partes iguais, e de seguida armazenadas em ambiente refrigerado. Só depois foram centrifugadas e coradas com a técnica de May Grunwald Giemsa. Verificou-se que 6 amostras das 32 se encontravam em avançado mau estado de conservação, pelo que nenhum elemento celular foi identificado.

**Análise semi quantitativa** - foi escolhido um método de contagem que apenas classificou os elementos celulares em ausentes, raros, frequentes e muito frequentes. Apesar deste tipo de classificação ser útil, seria mais fidedigno a contagem celular por citometria de fluxo, onde se poderia contar com precisão os elementos celulares presentes, e com isso tirar conclusões mais exatas, mas que apresenta os inconvenientes já apontados.

A partir das limitações identificadas, retiram-se, contudo, propostas para dar a continuidade prevista a este estudo, nomeadamente em relação à necessidade de se realizarem estudos comparativos com outras metodologias de fixação e coloração.

## Conclusão

O conhecimento da composição celular do fluido endometrial começou a ganhar importância e suscitar curiosidade na medida em que é no endométrio que ocorrem fenômenos importantíssimos como é o caso da gravidez.

Assim se descobriu que existe um processo inflamatório permanente no endométrio, e que este mesmo processo é essencial para o bom funcionamento do sistema reprodutor feminino.<sup>(3)</sup>

No entanto, ao longo do tempo, começou a tentar-se perceber o que acontecia a esse processo inflamatório em situações patológicas, na infertilidade inexplicada ou simplesmente em doentes com queixas sintomatológicas do foro ginecológico, como é o caso da dismenorreia primária. Assim, descobriu-se que este processo continuava presente, no entanto com alterações nos tipos, e sobretudo, na quantidade de alguns elementos celulares. Ou seja, após investigações, ficou evidente que os macrófagos, por exemplo, estão presentes em maior número na fase secretora do ciclo menstrual, tendo talvez por isso, um papel na menstruação.<sup>(29)</sup> Também se comparou a quantidade de macrófagos presentes nos endométrios normais e nos que apresentavam hiperplasia ou adenocarcinoma. Ficou claro que a quantidade de macrófagos aumentava nas situações hiperplásicas quando comparadas com situações normais, sem patologia, e ainda mais na presença de adenocarcinoma.<sup>(30)</sup> Também nas lesões de endometriose os macrófagos foram encontrados abundantemente.<sup>(32)</sup>

Por outro lado, um estudo demonstrou que os mastócitos podem estar envolvidos nos mecanismos da dor na endometriose, pois peptídios neurais, libertados pelas fibras nervosas nas lesões endometriais, podem induzir a desgranulação dos mastócitos, libertando histamina, proteases, citocinas e quimiocinas que contribuem para o desenvolvimento da dor.<sup>(17)</sup> Descobriu-se que esta desgranulação dos mastócitos está igualmente envolvida no implante do embrião no útero através da libertação não só de histamina, mas também de MMPs, triptase e VEGF.<sup>(21)</sup> Por clarificar está se os mastócitos, nas fases mais avançadas da gravidez, passam a ter um papel negativo a ponto de provocar partos pré termo.<sup>(18,19)</sup> Os pólipos endometriais também não escapam aos mastócitos, uma vez que estas são lesões inflamatórias associadas a hiperatividade destes mesmos elementos celulares.<sup>(20)</sup> De forma semelhante, também foram identificados mastócitos em leiomiomas.<sup>(23)</sup>

Os eosinófilos também foram investigados, e hoje sabe-se que participam na remodelação de tecidos e cicatrização de feridas, de forma que estão presentes mais abundantemente do que o esperado nas lesões endometriais, onde têm papel patogénico, e em leiomiomas, apesar de nestes casos ainda não se ter verificado qualquer significado clínico aparente.<sup>(24,25,26)</sup>

Investigações semelhantes concluíram que granulócitos e células T citotóxicas não apareciam em número significativo, quando comparadas com os tipos celulares referidos anteriormente, nas inúmeras situações clínicas relacionadas com o sistema reprodutor feminino.<sup>(28)</sup>

Assim neste trabalho, depois de uma pesquisa bibliográfica acerca da presença de células inflamatórias no endométrio em diferentes situações clínicas, tentou-se identificar essas células de interesse em lavados endometriais recolhidos durante o procedimento de uma histeroscopia. Testou-se uma metodologia simples, de fácil aplicabilidade que incluía a fixação do lavado com álcool a 50% em partes iguais, com posterior refrigeração. Esta fixação e armazenamento permitiu tratar as amostras num tempo diferente, de acordo com a disponibilidade do observador e do laboratório. Ao mesmo tempo permitiu acumular um maior número de amostras para posterior visualização. Antes da observação, as amostras foram sujeitas a um processo de centrifugação e coloração com May Grunwald Giemsa, o que permitiu identificar as células através da visualização ao microscópio ótico. Este trabalho pretendia identificar as células de interesse neste estudo (macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células epiteliais) em lavados endometriais e semi quantificá-las (ausentes, raras, frequentes e muito frequentes), através da visualização ao microscópio ótico, com a finalidade de tentar correlacioná-las com as situações clínicas das mulheres da amostra (pólipos endometriais, metrorragias, infertilidade, miomas uterinos, septo uterino, sinéquias, atrofia quística do endométrio, adenomiose e grupo sem patologia) . No final, tudo isto foi possível com as devidas limitações e cautela na interpretação dos resultados. As hipóteses colocadas foram confirmadas na sua maioria, ou seja foi possível utilizar material fixado para estudo das células do fluido endometrial; a coloração de May Grunwald Giemsa é aplicável ao estudo das células colhidas da cavidade uterina; a partir da visualização ao microscópio ótico encontraram-se mastócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células epiteliais. Quanto à hipótese que identificava uma relação entre o perfil celular do fluido endometrial e a situação clínica subjacente pode-se concluir que apesar de nenhuma relação propriamente dita ter sido identificada devido ao tamanho e características da amostra, a verdade é que o presente trabalho apresenta dados de que essa relação é possível. Portanto, um estudo semelhante de maiores dimensões, com pequenos ajustes na metodologia, partindo do mesmo princípio, poderá revelar informações importantes para que no futuro se possa tentar, através de uma análise semelhante a lavados endometriais, fazer diagnósticos, vigiar situações patológicas, e quem sabe até avaliar terapêuticas implementadas de acordo com a resposta da doença.

## Bibliografia

- 1- Hannan N., Paiva P., Meehan K., Rombauts L., Gardner D., Salamonsen L., (2011). Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. Endocrinology, 152(12): 4948-4956.
- 2- Casado-Vela J., Rodriguez-Suarez E., Iloro I., Ametzazurra A., Alkorta N., García-Velasco J., Matorras R., Prieto B., González S., Nagore D., Simón L., Elortza F., (2009). Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate. Journal of Proteome Research, 8: 4622-4632.
- 3- Maybin J., Critchley H., Jabbour H., (2011). Inflammatory pathways in endometrial disorders. Molecular and Cellular Endocrinology, 335(2011) 42-51.
- 4- Sheldon I., Bromfield J., (2011). Innate immunity in the human endometrium and ovary. American Journal of Reproductive Immunology, 66 (suppl.1):63-71.
- 5- Gnainsky Y., Granot I., Aldo P., Barash A., Or Y., Schechtman E., Mor G., Dekel N., (2010). Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. Fertil Steril, 94(6): 2030-2036.
- 6- Hickey R., Zhou X., Pierdson J., Ravel J., Forney L., (2012). Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. Translation Research, 160: 267-282.
- 7- Casslén B., Kobayashi T., Stormby N., (1982). Cyclic variation of the cellular components in human uterine fluid. Journals of Reproduction and Fertility, 66, 213-218.
- 8- Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G., (2010). Inflammation and implantation. American Journal of Reproductive Immunology, 63(1): 17-21.
- 9- Hannan N., Nie G., Rainczuk A., Rombauts L., Salamonsen L., (2012). Uterine lavage or aspirate: which view of the intrauterine environment? Reproductive Sciences, 19(10): 1125-1132.
- 10- Kaldensjo T., Petersson P., Tolf A., Morgan G., Broliden K., Hirbod T., (2011). Detection of intraepithelial and stromal langerin and CCR5 positive cells in the human endometrium: potential targets for HIV infection. PLOS ONE 6(6): e21344.
- 11- Ma H., Hong M., Duan J., Liu P., Fan X., Shang E., Su S., Guo J., Qian D., Tang Y., (2013). Altered cytokine gene expression in peripheral blood monocytes across the menstrual cycle in primary dysmenorrhea: a case-control study. PLOS ONE 8(2): e 55200
- 12- Park D., Yang K., (2011). Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. Clin Exp Reprod Med, 38(4): 179-185.
- 13- Reighard S., Sweet R., Vicetti Miguel C., Vicetti Miguel R.D., Chivukula M., Krishnamurti U., Cherpes T., (2011). Endometrial leukocyte associated with

- Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* genital tract infections. Am J Obstet Gynecol, 205(6): 324.e1-324.e7.
- 14- Jensen A., Collins J., Shipman E., Wira C., Guyre P., Pioli P., (2012). A subset of human uterine endometrial macrophages is alternatively activated. Am J Reprod Immunol, 68: 374-386.
  - 15- Granot I., Gnainsky Y., Dekel N., (2010). Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. Reproduction, 144: 661-668.
  - 16- Wira C., Fahey J., Sentman C., Pioli P., Shen L., (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunological Reviews, 206:306-335.
  - 17- Zhu L.; Zhang X.; (2013). Research advances on the role of mast cells in pelvic of endometriosis. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 42(4): 461-3.
  - 18- Menzies FM; Shepherd MC; Nibbs RJ; Nelson SM; (2011). The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour. Hum Reprod Update, 17(3):383-96.
  - 19- Woidacki K.; Jensen F.; Zenclussen AC.; (2013). Mast cells as novel mediators of reproductive processes. Front Immunol, 14;4:29.
  - 20- Al-Jefout M.; Black K.; Schulke L.; Berbic M.; Luscombe G.; Tokushige N.; Manconi F.; Maskham R.; Fraser IS.; (2009). Novel finding of high density of activated mast cells in endometrial polyps. Fertil Steril, 92(3):1104-6.
  - 21- Jensen F.; Wouldwyk M.; Teles A.; Woidacki K.; Tasan F.; Costa S.; Malfertheiner SF.; Zenclussen AC.; (2010). Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. PLoS One, 22;5(12): e14409
  - 22- Pansrikaew P.; Cheewakriangkrai C.; Taweewisit M.; Khunamorpong S.; Siriaunkgul S.; (2010). Correlation of mast cell density, tumor angiogenesis, and clinical outcomes in patients with endometrioid endometrial cancer. Asian Pac J. Cancer Prev, 11(3): 623-6.
  - 23- Lu JQ.; Zhu XQ.; Dong K.; Xiang M.; Lin Y.; Hu Y.; (2007). Study of the mechanism of mast cell increase in cellular leiomyoma of uterus. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 42(6): 390-3.
  - 24- Eidukaite A.; Tamosiunas V.; (2004). Activity of eosinophils and immunoglobulin E concentration in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Clin Chem Lab Med, 42(6): 590-4.
  - 25- Blumenthal RD., Samoszuk M., Taylor AP., Brown G., Alisauskas R., Goldenberg DM., (2000). Degranulating eosinophils in human endometriosis. Am J Pathol, 156(5): 1581-8.
  - 26- Vang R., Medeiros LJ., Samoszuk M., Deavers MT., (2001). *Uterine leiomyomas with eosinophils: a clinicopathology study of 3 cases*. Int J Gynecol pathol, 20(3): 239-43.

- 27- Aust G., Simchen C., Heider U., Hmeidan FA., Blumenaner V., Spanel-Borowski K., (2000). Eosinophils in the human corpus luteum: the role of RANTES and eotaxin in eosinophil attraction into periovulatory structures. Most Hum Reprod, 6(12):1085-91.
- 28- Salmassi A., Acar-Perk B., Schmutzler AG., Koch K., Purgel F., Jonat W., Mettler L., (2011). Apoptosis resistance in endometriosis. Bioimpacts, 1(2):129-34.
- 29- Eidukaite A.; Tamosiunas V.; (2004). Endometrial and peritoneal macrophages expression of activation and adhesion molecules. Am J Reprod Immunol, 52(2):113-7.
- 30- Dun EC.; Hanley K.; Wieser F.; Bohman S.; Yu J.; Tayler RN.;(2013). Infiltration of tumor associated macrophages is increased in the epithelial and stromal compartments of endometrial carcinomas. Int J Gynecol Pathol, 32(6):576:84.
- 31- Russel P.; Sacks G.; Tremellen K.; Gee A.; (2013). The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure: III Further observations and reference ranges. Pathology 45(4):393-401.
- 32- Capobianco A.; Rovere-Querini P.; (2013). Endometriosis, a disease of the macrophage. Front Immunol, 28;4:9.