

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Karine Silveira Ortiz

**INTERLEUCINA-6 NA ENDOMETRIOSE:
CONCENTRAÇÕES NO FLUÍDO PERITONEAL E EXPRESSÃO
PRÓTEICA NO TECIDO ENDOMETRIAL**

Porto Alegre

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Karine Silveira Ortiz

**INTERLEUCINA-6 NA ENDOMETRIOSE:
CONCENTRAÇÕES NO FLUÍDO PERITONEAL E EXPRESSÃO PROTEICA NO
TECIDO ENDOMETRIAL**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre, à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas: Endocrinologia.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Débora Martinho Morsch

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Poli Mara Spritzer

Porto Alegre, março de 2017.

CIP - Catalogação na Publicação

Ortiz, Karine Silveira

Interleucina-6 na endometriose: concentrações no
fluido peritoneal e expressão proteica no tecido
endometrial / Karine Silveira Ortiz. -- 2017.
37 f.

Orientador: Débora Martinho Morsch.

Coorientador: Poli Mara Spritzer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Endometriose. 2. Interleucina-6. 3. Tecido
endometrial. 4. Fluido peritoneal. I. Morsch, Débora
Martinho, orient. II. Spritzer, Poli Mara, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade.

Aos meus pais, familiares e amigos, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos dessa jornada. Em especial, à minha mãe Marilene, pela incansável dedicação. Obrigado por apoiar minhas escolhas e estimular meu crescimento sempre. A ti, meu muito obrigado mais que especial, de coração. Minhas vitórias serão sempre tuas também, obrigado por tudo!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Débora Martinho Morsch pela oportunidade, confiança, aprendizado e mentora do meu crescimento profissional, desde a iniciação científica.

À Prof^a. Dr^a. Poli Mara Spritzer pela confiança, ensinamentos, supervisão e acompanhamento da minha evolução como profissional.

À Prof^a. Dr^a. Andrea Prestes Nácúl e Raquel Camara Rivero pela colaboração no estudo, disponibilidade, atenção e incentivos.

Aos colegas Cíntia Tuset, Fernanda Míssio, Nathalia Costa e Ramon Bossardi do Serviço de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio e incentivo nos momentos de aperto e disponibilidade nas etapas dessa trajetória.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a execução deste Mestrado, desde o projeto até a dissertação, meus sinceros agradecimentos.

Sou resultado da confiança e apoio de todos vocês!

Enfim... Mestre!

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma revisão geral e um manuscrito sobre o tema da dissertação:

- Referencial Teórico: Endometriose e Interleucina-6
- Artigo original: Interleukin-6 in endometriosis: concentrations in peritoneal fluid and protein expression in endometrial tissue

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
PARTE I - Fundamentação Teórica	11
1. ENDOMETRIOSE.....	11
2. DIAGNÓSTICO E BIOMARCADORES.....	13
3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS.....	15
3.1 Citocinas e Interleucina-6.....	14
4. OBJETIVOS.....	17
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
PARTE II - Artigo original: Interleukin-6 in endometriosis: concentrations in peritoneal fluid and protein expression in endometrial tissue	23

RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica crônica que afeta pelo menos 10% das mulheres em idade reprodutiva. É caracterizada pelo crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Embora sua etiologia permaneça controversa, estudos propõem que alterações imunológicas e inflamatórias estão correlacionadas com a causa da endometriose e podem contribuir para o crescimento e sobrevivência de implantes ectópicos. Como parte integrante desse processo, um microambiente peritoneal anormal pode ser constituído por níveis aumentados de células imunológicas. Dentre estas, a elevação de citocinas pró-inflamatórias no ambiente peritoneal e sistêmico participariam desse processo. Citocinas incluindo a interleucina-6 (IL-6), uma glicoproteína com atuação na resposta imune e considerada como um marcador de inflamação tem sido proposta na patogênese da endometriose. Recentemente, demonstramos que as concentrações de IL-6 no fluido peritoneal (FP) apresentam-se elevadas em mulheres com endometriose em comparação com mulheres hígdas (Andrade *et al.*, 2017, in press). No entanto, a fonte do aumento de IL-6 no FP ainda não foi totalmente elucidada e seu potencial envolvimento com a endometriose merece maior investigação. No presente estudo, avaliamos a expressão proteica de IL-6 no tecido endometrial e sua concentração no FP de mulheres com endometriose pélvica e comparamos com mulheres hígdas. Um total de 18 pacientes com endometriose e 12 mulheres com pelve normal foram incluídas neste estudo caso-controle. Foram realizadas avaliações clínicas e laboratoriais. Os níveis de IL-6 no FP e a expressão proteica no tecido endometrial foram determinados utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunohistoquímica respectivamente. A concentração de IL-6 no FP foi significativamente mais elevada no grupo endometriose em comparação com o grupo controle [48,2 (36,7 - 89,9) ng/ml versus 23,1 (11,8 - 35,3) ng/ml, $P = 0,002$]. A expressão proteica de IL-6 foi positiva na maior parte das amostras de ambos os grupos sendo significativamente mais intensa no tecido endometriótico em comparação com a expressão no endométrio de mulheres com pelve normal ($P < 0,05$). Os resultados do presente estudo sugerem que a fonte da IL6 no FP de pacientes com endometriose possa ser, pelo menos em parte, proveniente dos focos endometrióticos.

Palavras-chave: endometriose, interleucina-6, tecido endometrial, fluido peritoneal.

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic gynecological disease that affects at least 10% of women of reproductive age. It is characterized by growth of endometrial tissue outside the uterine cavity. Although its etiology remains controversial, studies suggest that immunological and inflammatory changes are associated with endometriosis and may contribute to the growth and survival of ectopic implants. As part of this process, an abnormal peritoneal microenvironment may be constituted by increased levels of immune cells. Among these, the elevation of proinflammatory cytokines in the peritoneal and systemic environment would participate in this process. Cytokines including interleukin-6 (IL-6), a glycoprotein that acts on the immune response and is considered as a marker of inflammation has been proposed to play a role in the pathogenesis of endometriosis. Recently, we have shown that IL-6 concentrations in the peritoneal fluid (PF) were higher in women with endometriosis compared to healthy women (Andrade *et al.*, 2017, in press). However, the source of IL-6 in PF has not yet been fully elucidated and its potential involvement with endometriosis warrants further investigation. In the present study, we evaluated the protein expression of IL-6 in endometrial tissue and its concentration in PF of women with pelvic endometriosis and compared them with healthy women. A total of 18 patients with endometriosis and 12 women with normal pelvis were included in this case-control study. Clinical and laboratory evaluations were performed. IL-6 levels in PF and protein expression in endometrial tissue were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry respectively. The concentrations of IL-6 in PF were significantly higher in the endometriosis group compared to the control group [48.2 (36.7-89.9) ng / ml versus 23.1 (11.8-35, 3) ng / ml, $P = 0.002$]. Protein expression of IL-6 was positive in most samples from both groups being significantly more intense in the endometriotic tissue of patients with endometriosis compared to the endometrial expression in women with normal pelvis ($P < 0.05$). The results of the present study suggest that the source of IL6 in the PF of patients with endometriosis may come, at least in part, from the endometriotic focus.

Key words: endometriosis, interleukin-6, endometrial tissue, peritoneal fluid.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Expressão proteica de IL-6 no tecido endometrial por imunocoloração.....	40
Tabela 1: Características clínicas e hormonais da amostra estudada.....	41
Tabela 2: Frequência da expressão proteica de IL6 por imuno-histoquímica nas pacientes com endometriose e pelve normal (grupo controle).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CA-125 - Antígeno do câncer 125

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

FP - Flúido peritoneal

GnRH - Gonadotrophin-releasing hormone

IL-6 - Interleucina-6

IMC - Índice de massa corporal

LT - Ligadura tubária

PARTE I

Fundamentação Teórica:

1. ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma patologia ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial funcional (glândulas e/ou estroma) (Nácul e Spritzer, 2010; Nácul *et al.*, 2013), localizados em sítios extrauterinos (Burns e Schenken, 1999), mais comumente no peritônio pélvico e ovários e, mais raramente no pericárdio, pleura e sistema nervoso central (Abrão *et al.*, 2010; Nácul e Spritzer, 2010).

Três formas de endometriose são clinicamente descritas: implantes endometrióticos na superfície do peritônio pélvico e ovários (endometriose peritoneal), cistos ovarianos alinhados pela mucosa endometriode (endometriomas) e uma massa sólida mista composta de tecido endometrial, tecido adiposo e fibromuscular, residente entre o reto e a vagina (nódulo endometriótico retovaginal). Suas características histológicas comuns são a presença de estroma endometrial ou células epiteliais, sangramento crônico e sinais de inflamação. Estas lesões podem ocorrer isoladamente ou em combinação e estão associadas a um risco aumentado de infertilidade e/ou dor pélvica crônica (Bulun, 2009).

Estudos apontam uma prevalência de até 20% das mulheres em idade reprodutiva (Matarese *et al.*, 2003; Bricou *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2012) e que de 30 a 50% das mulheres com infertilidade apresentam a patologia (Jacobson *et al.*, 2002; Lasmar *et al.*, 2012).

A etiopatogenia da endometriose ainda não se encontra bem estabelecida (Nácul e Spritzer, 2010; Sourial *et al.*, 2014). Muitas hipóteses têm sido propostas a fim de esclarecer o mecanismo etiopatogênico (Giudice, 2010; Carvalho *et al.*, 2011), com evidências indicando que uma combinação de fatores genéticos, hormonais e imunológicos poderia contribuir para a formação e desenvolvimento dos focos endometriais ectópicos (Kennedy *et al.*, 2005; Christodoulakos *et al.*, 2007).

A endometriose não era reconhecida como entidade patológica até o século XVIII. Porém, desde sua descrição por Sampson em 1927, passou a ter sua teoria como a mais aceita para explicar a origem da endometriose. De acordo com esse autor, ocorreria o refluxo de

endométrio uterino durante a menstruação através das trompas de falópio, com subsequente implantação e crescimento no peritônio e ovário (Sampson, 1927). Em contrapartida a respeito dessa teoria, é discutido que, embora 70 a 90% das mulheres apresentem menstruação retrógrada, apenas uma minoria (Bricou *et al.*, 2008) correspondendo de 6 a 10% irá desenvolver a patologia (Giudice e Kao, 2004; Groothuis *et al.*, 2005) sugerindo assim, que outros fatores envolvidos poderiam determinar uma maior suscetibilidade para desenvolver a doença (Nap, Groothuis, *et al.*, 2004; Morsch *et al.*, 2009; Nácúl e Spritzer, 2010).

Outras duas teorias também foram consideradas na tentativa de explicar a endometriose: a da metaplasia celômica, sugerindo que o endométrio ectópico se desenvolve nos tecidos locais, incluindo o epitélio germinativo ovariano ou remanescente dos ductos de Wolf e de Muller; e, por fim, a teoria da indução, englobando as outras duas (implantes e metaplasia celômica) e sugerindo que substâncias endógenas secretadas pelo endométrio menstrual degenerado induziriam a metaplasia do epitélio seroso dos ovários e células peritoneais do mesotélio em tecido endometrial (Levander e Normann, 1955; Ohtake *et al.*, 1999).

A implantação de células endometriais ectópicas tem sido relacionada a vários fatores, tais como um ambiente receptivo que permitiria a adesão, proliferação e sobrevivência dessas células e uma resposta alterada do sistema imunológico às mesmas (Christodoulakos *et al.*, 2007). Assim, especula-se cada vez mais que a endometriose seja uma patologia crônica de origem imunológica e/ou inflamatória (Gazvani e Templeton, 2002; Matarese *et al.*, 2003; Burney, 2013).

Muitos autores têm demonstrado interesse em tentar esclarecer o papel do sistema imunológico na endometriose onde várias anormalidades têm sido detectadas nessa associação. Podemos citar alguns fatores já conhecidos, provavelmente correlacionados à sobrevivência do tecido endometrial na cavidade peritoneal como: maior capacidade proliferativa, maior atividade da atomatase resultando em aumento das concentrações locais de estrogênio, resistência à ação da progesterona e alteração da relação local estrogênio-progesterona (Christodoulakos *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010).

Considera-se também que a expressão aumentada de genes envolvidos com o mecanismo de apoptose celular pode aumentar a sobrevivência dessas células dentro da cavidade peritoneal que, interagindo com moléculas de adesão, poderão aderir à superfície peritoneal (Morsch *et al.*, 2009). A ativação de quantidades elevadas de macrófagos no líquido

peritoneal pode também estar associada à secreção de diversas citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e de angiogênese, que desencadeiam a implantação e invasão desse tecido endometrial ectópico (Nácul e Spritzer, 2010).

2. DIAGNÓSTICO E BIOMARCADORES

Tradicionalmente a suspeita clínica de endometriose recai especialmente em pacientes com queixa de dor pélvica e/ou infertilidade por serem essas as manifestações mais frequentes. Contudo, o quadro clínico pode ser bastante variável, podendo a paciente ser assintomática, referindo apenas infertilidade ou apresentar sintomas como dismenorreia severa, dispareunia profunda, graus variáveis de dor pélvica (até dor crônica), dor ovulatória, irregularidade menstrual, alterações intestinais e urinárias durante o período menstrual e fadiga crônica (Kennedy *et al.*, 2005; Abrão *et al.*, 2010).

A história clínica, a avaliação ginecológica completa associada aos exames laboratoriais complementares, como dosagem de CA-125 e métodos de imagem como ultrasonografia transvaginal, são passos básicos para se iniciar o mapeamento da suspeita da patologia. (Abrão *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2012).

O diagnóstico confirmatório e padrão ouro da patologia, porém, só ocorre por videolaparoscopia combinada com a confirmação histológica pelo exame anatomopatológico da biópsia da lesão para constatação da presença do tecido endometrial ectópico (Kennedy, 1999). Este pode ser feito através de cirurgia, laparotomia, ou preferencialmente, laparoscopia. A laparoscopia é um procedimento cirúrgico, realizado com anestesia geral, onde é realizada a inspeção e manipulação da cavidade abdominal e pélvica através de instrumentos de ótica e vídeo, bem como de instrumentos cirúrgicos específicos que são introduzidos através de pequenos orifícios no abdômen (Scarselli *et al.*, 2005; Guzel *et al.*, 2014).

Após a realização da videolaparoscopia, a endometriose pode ser classificada de acordo com o tipo histológico dos implantes, com a localização anatômica ou sobre a extensão da doença sobre os órgãos pélvicos. A classificação mais utilizada atualmente é a da *American Society of Reproductive Medicine* - revisada em 1996, que gradua a endometriose em estádios de I a IV sendo eles, endometriose mínima (I), leve (II), moderada (III) ou grave (IV) de acordo com a extensão da doença no peritônio e ovários, bem como pela presença de

aderências tubo-ovarianas e bloqueio do fundo de saco de Douglas (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997).

Entretanto, existe uma fraca correlação entre a gravidade da doença e os sintomas clínicos apresentados pelas pacientes. Esta heterogeneidade na apresentação clínica tem dificultado a identificação de marcadores de diagnósticos. Alguns possíveis marcadores bioquímicos séricos, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento têm sido investigados como parte da abordagem diagnóstica da endometriose. A resposta inflamatória associada com a doença poderia fornecer outros marcadores bioquímicos. O tecido endometrial poderia ser a origem dos níveis circulantes de tais substâncias que estariam aumentadas na corrente sanguínea (Vercellini *et al.*, 2009; Somigliana *et al.*, 2010). Relatos têm proposto que marcadores séricos, teciduais e do fluído peritoneal estejam potencialmente associados à endometriose (Yang *et al.*, 2004). Níveis elevados de CA-125, por exemplo, podem ser sugestivos, mas não indicativo de endometriose devido às diversas condições fisiológicas e patológicas que podem ser responsáveis por esse aumento, como por exemplo, outros cistos benignos de ovário. Por outro lado, valores normais de CA-125 apresentam baixo valor preditivo negativo, pois não excluem a presença de endometriose (Mol *et al.*, 1998). Mais recentemente, algumas citocinas vêm sendo estudadas por estarem envolvidas na patogênese da endometriose bem como possíveis novos marcadores não cirúrgicos para a doença, já que até o momento, nenhum marcador bioquímico isolado pôde ser considerado como fidedigno para o diagnóstico (Kennedy *et al.*, 2005; May *et al.*, 2010).

Os tratamentos para endometriose envolvem a administração de androgênios, agonistas do GnRH, progestinas e/ou contraceptivos orais. Entretanto, os medicamentos para diminuir as concentrações circulantes de estrogênios não podem ser usados continuamente devido aos possíveis efeitos adversos (como osteoporose e risco à doença cardiovascular) ou a pretensão de gravidez. Para o tratamento da dor, as pacientes são submetidas a cirurgias frequentes, embora sejam desaconselhadas por aumentarem a chance de aderências peritoniais. Para Giudice e Kao (2004), cerca de 75% das pacientes apresentam recidiva dos sintomas dois anos após a cirurgia. Quanto mais avançado o estágio da endometriose ao primeiro diagnóstico, maior a recorrência da detecção clínica da doença (Giudice e Kao, 2004).

3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS

3.1 Citocinas e Interleucina-6

Um conceito geral importante é que a endometriose é um processo inflamatório pélvico local crônico com função alterada das células imuno-correlacionadas no ambiente peritoneal. Acredita-se que as alterações imunológicas e inflamatórias nos níveis celular e molecular na endometriose podem contribuir para a sobrevivência e crescimento dos implantes endometrióticos, podendo afetar a fertilidade e causar dor crônica com o início da reação inflamatória (Harada *et al.*, 1997).

Quando o corpo é afetado na sua integridade são desencadeados mecanismos de restauração através de um processo de reações bioquímicas, nas quais os fluídos e os leucócitos (células de defesa) circulantes se acumulam no tecido extravascular em resposta às lesões e infecções. Com isso, ocorrem efeitos locais, como hiperemia, edema e infiltração leucocitária desencadeando a resposta inflamatória. Esse processo de resposta é extremamente complexo, envolve numerosos tipos de células e mediadores humorais, além de inúmeras substâncias, sendo o grupo das citocinas o mais importante (Dandona *et al.*, 2007).

É provável que um ambiente imune alterado na cavidade peritoneal com uma variedade de citocinas e fatores de crescimento derivados de macrófagos ativados, células de endometriose e células mesoteliais na cavidade abdominal de mulheres com endometriose possam desempenhar um papel inicial para o desenvolvimento da doença, embora sua etiologia ainda permaneça desconhecida (Bedaiwy *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2004; Kalu *et al.*, 2007). Por sua vez, a proliferação e/ou diferenciação celular do endométrio são acompanhadas da indução de inúmeras proteínas e/ou citocinas (fatores de crescimento, de angiogênese, interleucinas, interferons) (Salmassi *et al.*, 2008).

Evidências apontam que inúmeras células do sistema imune residem no tecido endometrial, respondendo por parte da fisiopatologia da endometriose, à medida que induzem uma série de eventos inerentes à inflamação, tais como proliferação, invasão e angiogênese (Lebovic *et al.*, 2001).

Existem diversos marcadores associados com a inflamação como, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, adipocinas, marcadores de inflamação derivados de hepatócitos, marcadores de consequência da inflamação, enzimas, entre outros. Além disso, segundo alguns estudos, as doenças crônicas são acompanhadas

pelos processos inflamatórios e a presença de inflamação pode preceder o futuro desenvolvimento destas doenças (Wu e Wu, 2006).

Apoiando essa noção estudos recentes sugerem que há localmente, uma reação imune em conjunto com os implantes ectópicos dentro da cavidade peritoneal de pacientes com endometriose em que o fluido peritoneal dessas mulheres contém um aumento no número de macrófagos ativados que segregam vários produtos locais, tais como citocinas, fatores de crescimento e substâncias angiogênicas (Harada *et al.*, 2001)

Citocinas são peptídeos reguladores produzidos por vários tipos de células nucleadas no organismo e atuam como reguladores pleiotrópicos em muitos tipos celulares. Desempenham um papel importante na iniciação, propagação, e regulação de respostas imunes e inflamatórias. Em mulheres com endometriose, as citocinas atraem e recrutam mais células imunes e assim, promovem a implantação e o crescimento de células endometriais ectópicas através da indução da proliferação e angiogênese, que desta forma, pode contribuir para a fixação de células do endométrio na cavidade peritoneal e ajudar a invasão destas células no mesotélio (Verit e Ayas, 2010; Barcz *et al.*, 2012).

Os níveis de citocinas não refletem diretamente o estado imune, mas demonstram a ativação do sistema imune adjacente. A principal fonte de citocinas são os macrófagos, que se originam na medula óssea, circulam para diversas cavidades do corpo. Níveis aumentados de citocinas no fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose podem refletir o aumento da síntese de citocinas por macrófagos peritoneais, linfócitos, implantes endometriais ectópicos, ou por células do mesotélio no peritônio (Verit e Ayas, 2010; Barcz *et al.*, 2012).

A resposta inflamatória está associada à liberação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-6, que se apresenta como um dos maiores mediadores de resposta de fase aguda. A IL-6 normalmente é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes. Esta citocina desempenha inúmeras funções nos efeitos imunes celulares e relacionados à inflamação e defesa do hospedeiro (Salmassi *et al.*, 2008).

O papel da IL-6 na patogênese da Endometriose vem sendo amplamente estudado, porém a fonte de seus níveis aumentados, tanto no FP como no soro de pacientes ainda não foi esclarecida (Bedaiwy e Falcone, 2004; Agic *et al.*, 2006). No entanto, a expressão proteica de IL-6 no tecido endometriótico, tem sido pouco explorada.

4. OBJETIVO

Avaliar a expressão proteica de IL-6 no tecido endometrial e sua concentração no FP de mulheres com endometriose pélvica e compará-las com mulheres híginas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. S. et al. Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected. **Fertil Steril**, v. 94, n. 3, p. 1099-101, Aug 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004387> >.

_____. Tumor markers in endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 66, n. 1, p. 19-22, Jul 1999. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458545> >.

AGIC, A. et al. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? **Gynecol Obstet Invest**, v. 62, n. 3, p. 139-47, 2006. ISSN 0378-7346. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679772> >.

BARCZ, E. et al. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. **Fertil Steril**, v. 97, n. 6, p. 1380-6.e1, Jun 2012. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542989> >.

BEDAIWY, M. A. et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. **Hum Reprod**, v. 17, n. 2, p. 426-31, Feb 2002. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821289> >.

BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T. Laboratory testing for endometriosis. **Clin Chim Acta**, v. 340, n. 1-2, p. 41-56, Feb 2004. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734195> >.

BRICOU, A.; BATT, R. E.; CHAPRON, C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 138, n. 2, p. 127-34, Jun 2008. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336988> >.

BULUN, S. E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144942> >.

BURNEY, R. O. The genetics and biochemistry of endometriosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 25, n. 4, p. 280-6, Aug 2013. ISSN 1473-656X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759832> >.

BURNS, W. N.; SCHENKEN, R. S. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 42, n. 3, p. 586-610, Sep 1999. ISSN 0009-9201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451772> >.

CARVALHO, L. et al. Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis. **J Minim Invasive Gynecol**, v. 18, n. 4, p. 419-27, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1553-4669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620779> >.

- CARVALHO, L. F. et al. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n. 4, p. 1033-40, Oct 2012. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791380> >.
- CHRISTODOULAKOS, G. et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. **Eur J Contracept Reprod Health Care**, v. 12, n. 3, p. 194-202, Sep 2007. ISSN 1362-5187. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17763257> >.
- DANDONA, P. et al. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v. 99, n. 4A, p. 15B-26B, Feb 2007. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307055> >.
- GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 217-26, Feb 2002. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866688> >.
- GIUDICE, L. C. Clinical practice. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 25, p. 2389-98, Jun 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573927> >.
- GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, 2004 Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.
- GROOTHUIS, P. G. et al. Vascular development in endometriosis. **Angiogenesis**, v. 8, n. 2, p. 147-56, 2005. ISSN 0969-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211360> >.
- GUZEL, A. I. et al. Recurrence factors in women underwent laparoscopic surgery for endometrioma. **Minerva Chir**, v. 69, n. 5, p. 277-82, Oct 2014. ISSN 0026-4733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267018> >.
- HARADA, T.; IWABE, T.; TERAOKAWA, N. Role of cytokines in endometriosis. **Fertil Steril**, v. 76, n. 1, p. 1-10, Jul 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438312> >.
- HARADA, T. et al. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 176, n. 3, p. 593-7, Mar 1997. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077612> >.
- JACOBSON, T. Z. et al. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD001398, 2002. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519555> >.
- KALU, E. et al. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 33, n. 4, p. 490-5, Aug 2007. ISSN 1341-8076. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688616> >.

KENNEDY, S. The genetics of endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 82, n. 2, p. 129-33, Feb 1999. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206402> >.

KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod**, v. 20, n. 10, p. 2698-704, Oct 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980014> >.

KHAN, K. N. et al. Higher activity by opaque endometriotic lesions than nonopaque lesions. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 83, n. 4, p. 375-82, Apr 2004. ISSN 0001-6349. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005786> >.

LASMAR, R. B.; LASMAR, B. P.; PILLAR, C. Diagram to map the locations of endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 118, n. 1, p. 42-6, Jul 2012. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507261> >.

LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 75, n. 1, p. 1-10, Jan 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163805> >.

LEVANDER, G.; NORMANN, P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 34, n. 4, p. 366-98, 1955. ISSN 0001-6349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13301610> >.

MATARESE, G. et al. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? **Trends Mol Med**, v. 9, n. 5, p. 223-8, May 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763528> >.

MAY, K. E. et al. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 6, p. 651-74, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20462942> >.

MOL, B. W. et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 70, n. 6, p. 1101-8, Dec 1998. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848302> >.

MORSCH, D. M. et al. c-fos gene and protein expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action. **J Mol Histol**, v. 40, n. 1, p. 53-8, Feb 2009. ISSN 1567-2387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199093> >.

NAP, A. W. et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 3, p. 1089-95, Mar 2004. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001592> >.

_____. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 233-44, Apr 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157640> >.

NÁCUL, A. P. et al. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. **Obstet Gynecol Int**, v. 2013, p. 879618, 2013. ISSN 1687-9589. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634146> >.

NÁCUL, A. P.; SPRITZER, P. M. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 6, p. 298-307, Jun 2010. ISSN 1806-9339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945016> >.

OHTAKE, H. et al. A novel in vitro experimental model for ovarian endometriosis: the three-dimensional culture of human ovarian surface epithelial cells in collagen gels. **Fertil Steril**, v. 71, n. 1, p. 50-5, Jan 1999. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935115> >.

RAMOS, I. M. et al. Evaluation of CA-125 and soluble CD-23 in patients with pelvic endometriosis: a case-control study. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 1, p. 26-32, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392313> >.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, May 1997. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130884> >.

SALMASSI, A. et al. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. **Fertil Steril**, v. 89, n. 5 Suppl, p. 1578-84, May 2008. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953945> >.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **Am J Pathol**, v. 3, n. 2, p. 93-110.43, Mar 1927. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SCARSELLI, G. et al. Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. **Minerva Ginecol**, v. 57, n. 1, p. 55-78, Feb 2005. ISSN 0026-4784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758866> >.

SHARMA, I. et al. Implication of the RAGE-EN-RAGE axis in endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 110, n. 3, p. 199-202, Sep 2010. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537326> >.

SOMIGLIANA, E. et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis: the goal or own goal? **Hum Reprod**, v. 25, n. 8, p. 1863-8, Aug 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519246> >.

SOURIAL, S.; TEMPEST, N.; HAPANGAMA, D. K. Theories on the pathogenesis of endometriosis. **Int J Reprod Med**, v. 2014, p. 179515, 2014. ISSN 2356-7104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25763392> >.

VERCELLINI, P. et al. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 254-69, Feb 2009. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948311> >.

VERIT, F. F.; AYAS, S. Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. **Fertil Steril**, v. 94, n. 1, p. e31; author reply e32, Jun 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385382> >.

WU, J. T.; WU, L. L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. **Clin Chim Acta**, v. 366, n. 1-2, p. 74-80, Apr 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343470> >.

YANG, W. C. et al. Serum and endometrial markers. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 305-18, Apr 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157644> >.

PARTE II

Artigo original:

Interleukin-6 in endometriosis: concentrations in peritoneal fluid and protein expression in endometrial tissue

Interleukin-6 in endometriosis: concentrations in peritoneal fluid and protein expression in endometrial tissue

Karine Silveira Ortiz^{1*}, Andréa Prestes Nácul^{2*}, Raquel Camara Rivero³, Poli Mara Spritzer^{1,4} and Débora Martinho Morsch¹

¹Gynecological Endocrinology Unit, Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Human Reproduction Unit, Hospital Fêmeina - Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³Pathology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Laboratory of Molecular Endocrinology, Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Contributed equally

Corresponding author: Dr Débora Martinho Morsch

Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail: dmmorsch@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: Endometriosis is a chronic gynecological disease that affects at least 10% of women of reproductive age. It is characterized by growth of endometrial tissue outside the uterine cavity. Although its etiology remains controversial, studies suggest that immunological and inflammatory changes are associated with endometriosis and may contribute to the growth and survival of ectopic implants. As part of this process, an abnormal peritoneal microenvironment may be constituted by increased levels of immune cells. Among these, the elevation of proinflammatory cytokines in the peritoneal and systemic environment would participate in this process. Cytokines including interleukin-6 (IL-6), a glycoprotein that acts on the immune response and is considered as a marker of inflammation has been proposed to play a role in the pathogenesis of endometriosis. Recently, we have shown that IL-6 concentrations in the peritoneal fluid (PF) were higher in women with endometriosis compared to healthy women (Andrade *et al.*, 2017, in press). However, the source of IL-6 in PF has not yet been fully elucidated and its potential involvement with endometriosis warrants further investigation. **Objective:** To compare the protein expression of IL-6 in endometrial tissue and its concentrations in the PF between women with pelvic endometriosis and to healthy women. **Methods:** A total of 18 patients with endometriosis and 12 women with normal pelvis were included in this case-control study. Clinical and laboratory evaluations were performed. IL-6 levels in PF and protein expression in endometrial tissue were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry respectively. **Results:** The concentrations of IL-6 in PF were significantly higher in the endometriosis group compared to the control group [48.2 (36.7-89.9) ng / ml versus 23.1 (11.8-35, 3) ng / ml, $P = 0.002$]. Protein expression of IL-6 was positive in most samples from both groups being significantly more intense in the endometriotic tissue of patients with endometriosis compared to the endometrial expression in women with normal pelvis ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The results of the present study suggest that the source of IL6 in the PF of patients with endometriosis may come, at least in part, from the endometriotic focus.

Key words: endometriosis, interleukin-6, endometrial tissue, peritoneal fluid.

INTRODUCTION

Endometriosis is a chronic gynecological disease that affects at least 10% of women of childbearing age (Sampson, 1927; Maathuis *et al.*, 1978; Matarese *et al.*, 2003; Malutan *et al.*, 2015). It is characterized by the growth of endometrial tissue (active endometrial glands and stroma), outside the uterine cavity, more frequently in the ovaries and peritoneum (Hornung *et al.*, 2001; Giudice e Kao, 2004; Dovey e Sanfilippo, 2010). Although its etiology remains controversial (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001), the most accepted theory proposes that a retrograde menstruation flow would generate endometriotic implants along the reproductive tract (Sampson, 1927; Solnik, 2006; Dovey e Sanfilippo, 2010). However, this theory does not fully explain the pathogenesis of endometriosis and additional yet unknown mechanisms should contribute to the implantation, proliferation and survival of the endometrium outside the uterine cavity (Braun e Dmowski, 1998; D'hooghe e Debrock, 2002).

Studies suggest that immunological and inflammatory changes at the cellular and molecular levels are possibly correlated with the cause of endometriosis and may contribute to the growth and survival of ectopic implants (Nap, Groothuis, *et al.*, 2004; Ohata *et al.*, 2008; Ponce *et al.*, 2009). As an integral part of this process, an abnormal peritoneal microenvironment may consist of increased levels of immunological cells (Nap, Groothuis, *et al.*, 2004; Ohata *et al.*, 2008) which play an important role in cellular adhesion, growth, angiogenesis and inflammation (Senturk e Arici, 1999; Gazvani e Templeton, 2002; Kats *et al.*, 2002; Nap, Griffioen, *et al.*, 2004; Ponce *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2013). Among these, the elevation of proinflammatory cytokines concentration and growth factors in the peritoneal and systemic environment would participate in this process (Akoum, Lemay, Mccoll, *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 2001; Kats *et al.*, 2002).

Cytokines including interleukin-6 (IL-6) have been proposed in the pathogenesis of endometriosis. IL-6 is a glycoprotein with activity in the immune response and is considered a marker of inflammation (Smith *et al.*, 1997). It is derived from T cells and is secreted by endometrial cells among other cell types and mainly by macrophages (Laird *et al.*, 1993; Keenan *et al.*, 1994). Peritoneal fluid (PF) levels of this cytokine seem to be elevated in women with endometriosis compared to healthy women (Andrade *et al.*, 2017, in press). These findings suggest that endometriotic implants are also a source of cytokines (Akoum, Lemay, Paradis, *et al.*, 1996; Tsudo *et al.*, 2000; Bedaiwy e Falcone, 2004). Evidence indicates a potential involvement of IL-6 in the pathogenesis of endometriosis, which

warrants further investigation. Thus, the present study aimed to compare the protein expression of IL-6 in endometrial tissue and its concentrations in the PF between women with pelvic endometriosis and healthy women.

METHODOLOGY

A total of 30 patients submitted to gynecological laparoscopy at the Reproductive Unit of the Hospital Fêmima - GHC between September 2007 and March 2009 were included in the present study. Of these, 18 women with endometriosis, confirmed during the procedure by visualization of endometriotic implants or by histopathological examination of sites suggestive of active endometriosis and 12 healthy women with no evidence of endometrial disease according to histopathological examination submitted to laparoscopy for tubal ligation were included as endometriosis and control group (normal pelvis), respectively. The inclusion criteria were: I) pre-menopausal women aging between 21 and 50 years and II) not using contraceptive pills or hormonal therapy for at least 3 months before the laparoscopy. Exclusion criteria were body mass index (BMI) > 35, or presenting other pelvic diseases than endometriosis.

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Fêmima - GHC and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All participants signed a free and informed consent.

Study Protocol:

Participants from both groups were submitted to clinical evaluation and the same surgeon performed the laparoscopies, who also confirmed the diagnosis and classified endometriosis according to the revised American Society for Reproductive Medicine classification (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997).

Immediately prior to laparoscopy, peripheral venous blood samples were collected, and PF was collected immediately following the beginning of the procedure. PF samples were centrifuged and supernatants were stored at -80 °C until be processed.

Serum hormone measurements: Serum estradiol and progesterone were assayed by electrochemiluminescence (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Intra and interassay coefficients of variation (CVs) were > 5%.

PF IL-6 dosages: IL-6 levels were determined using a human enzyme-linked immunosorbent assay with a detection limit of 3.10 pg/ml (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, USA). Analyses were performed in duplicate in accordance with the manufacturer's instructions and two quality control samples were used. Intra and interassay CVs were 5.3 and 12.4%, respectively.

Tissue collection: Biopsies of endometriotic and endometrial samples from cases and controls, respectively, were collected before the end of the video laparoscopy procedure. Samples were immediately placed in formalin and transported to the laboratory for further preparation for the immunohistochemistry technique.

Immunohistochemistry: The technique was performed on specimens of endometrial and ectopic lesions obtained by biopsy, fixed in 10% buffered formalin, processed and included in paraffin, which were submitted to histological cut in a microtome regulated to a thickness of 4 µm. The sections were positioned on previously flagged slides. In order to proceed with the immunohistochemical technique by the peroxidase reaction, the slides were heated in an oven at 80°C for 30 minutes, followed by dewaxing in xylol, rehydration in ethyl alcohol and then in distilled water. Antigenic recovery was performed in a water bath at 95° C for 20 minutes in citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution in methanol for 20 minutes. The sections were then incubated overnight in a refrigerator at 2 to 8°C with the primary mouse Anti-IL6 monoclonal Mouse (Santa Cruz Biotechnology, USA) Clone: IL-6 at 1:50 dilution. After incubation, the Goat anti-mouse IgG HRP Conjugated Secondary Antibody - cod: sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology, USA) detection system was applied at 1: 200 dilution and incubated again for 1h and 30 minutes. The visualization of the reaction was obtained with Liquid Dab (Dako, K3468), according to the manufacturer's recommendations. After visualization, the slides were counterstained in Harris hematoxylin for 10 seconds, and differentiated into 2% ammoniacal water for 30 seconds. The slices were dehydrated in absolute alcohol and placed in xylol for the assembly

of the blades in Entellan type resin. All samples were analyzed together, including negative control in which the primary antibody was replaced with phosphate buffered saline (PBS) cod: 590338 (Laborclin). A positive reaction was characterized by the presence of brown granular staining in the epithelium and / or stroma. The intensity of immunostaining was assessed by two independent observers and classified as absent, weak, moderate or intense and converted into arbitrary units on a semi-quantitative scale of 0 to 3 for subsequent statistical analysis.

Statistical analysis: Results are presented as mean \pm standard deviation or median and interquartile range (25-75%). Comparisons between means were analyzed using the unpaired two-tailed Student's t-test or Mann-Whitney U test. The χ^2 test was used to compare qualitative variables. Pearson's or Spearman's rank correlation coefficients were calculated between variables using a two-tailed test for significance. Log_{10} transformation was used to normalize the distribution of non-Gaussian variables and mean values were back-transformed for presentation. $P < 0.05$ was considered to indicate a statically significant difference. The Statistical Package for the Social Sciences version 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform analyses.

RESULTS

Table 1 shows the clinical and hormonal profile of the participants. Women with normal pelvis and endometriosis presented similar age and BMI (31.7 ± 6.0 vs 31.1 ± 5.8 years, $P = 0.78$) and (24.9 ± 4.6 vs 24.2 ± 5.7 kg / m², $P = 0.72$). The groups did not differ regarding circulating levels of estradiol and progesterone ($P > 0.05$). Endometriosis was classified as minimal or mild (grade I or II) in 10 (55.6%) patients and moderate or severe (grade III or IV) in 8 (44.4%) patients (Table 1).

IL-6 levels were detected in the PF of all patients in both groups. The concentration of IL-6 was significantly higher in the endometriosis group [48.2 (36.7-89.9) ng/ml] compared to the control group [23.1 (11.8-35.3 ng/ml ml, $P = 0.002$] (Table 1).

Protein expression of IL-6 in endometrial tissue was detected in all samples evaluated from the endometriosis and control groups. IL-6 expression was significantly more intense in ectopic lesions than in the endometrium of women with normal pelvis ($P = 0.028$) (Table 2).

Figure 1 shows IL-6 weak positive immunostaining in endometrial tissue of control women (A). A strong positivity was observed in ectopic implants from patients with endometriosis (B and C).

DISCUSSION

In the present study, a more intense IL-6 immunostaining was found endometriotic implants in comparison with the eutopic endometrium of women with normal pelvis. These results are in agreement with the findings described by Tsudo et al. (2000) where IL-6 protein expression was investigated in endometriotic stromal cells in culture and demonstrated increased significant expression when compared to normal endometrial tissue. Tseng et al. (1996) also demonstrated *in vitro* that stromal cells have a higher level of cytokine expressed in isolated cells from endometriosis implants when compared to isolated cells from normal endometrial tissue.

Studies on the pathogenesis of endometriosis point to innumerable suggestions covering a range of possible mechanisms involved (Starzinski-Powitz *et al.*, 2001; Bulun, 2009). Indeed, the combination of immune and inflammatory factors have been described for decades as well established mechanisms linked to endometriosis (Senturk e Arici, 1999; Taylor, 2010; Batt, 2011). As an integral part of this process, an increase in activated macrophages and lymphocytes has been reported in endometriosis, triggering an inflammatory peritoneal environment associated with the overproduction of prostaglandins, cytokines and growth factors, thus favoring the survival and proliferation of endometriotic lesions (Lebovic *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2015).

Studies indicate that in women with endometriosis cytokines may regulate PF content or may act directly on the ectopic endometrium, where they may play several roles in the pathogenesis and pathophysiology of endometriosis (Harada *et al.*, 2001). Clinical and experimental evidence also suggests that IL-6 reacts on the local inflammatory and immune response in endometriosis (Paul Dmowski e Braun, 2004), but the mechanisms by which this occurs have not been explored yet.

Previous studies of our group have demonstrated that peritoneal IL-6 levels are increased in endometriosis and, correlate positively with the greater severity of the disease (Andrade, *et al.*, 2017, in press). Our data are in accordance with reports by Kalu et al. (2007) e Mosbah et al. (2016) that identified significantly higher levels of IL-6 in the PF of patients

with endometriosis when compared with the control group and also showed a correlation of IL-6 with the stage of endometriosis. Kocbek et al. (2015) showed the same significance for increased cytokine levels in PF, but in cases of ovarian endometriosis. These results from different authors regarding the increase of IL-6 levels in the PF of women with endometriosis confirm a local immunoinflammatory reaction in which active immune cells produce larger amounts of proinflammatory cytokines.

The origin of high level production of IL-6 in endometriosis has not yet been fully elucidated. Laird et al. (1993), Keenan et al. (1994) and Berkkanoglu and Arici (2003) reported the presence of macrophages and leukocytes in peritoneal environment as sources of IL-6. However, this does not exclude other sources of IL-6 in pathological conditions and other factors that could contribute to the process. In this sense, the adipose tissue is a well-known source of cytokines production. We have previously studied the IL-6 gene expression in adipose tissue, of women with endometriosis versus control women. However, no difference was found on IL-6 gene expression of both visceral and subcutaneous adipose tissue between endometriosis and normal pelvis groups (Andrade *et al.*, 2017, in press). In turn, it is worth noting, that once the ectopic lesion has been established, high levels of proinflammatory molecules, including the IL-6 cytokine may reflect not only their increased synthesis by peritoneal macrophages but also the own endometriotic lesion derived production, in addition to other immune cells signaling the inflammatory process (Lebovic *et al.*, 2001; Giudice e Kao, 2004).

One limitation of the present study is the small number of participants and the endometrial samples had been mainly collected in follicular phase, which did not allow us to test some complementary analyzes, such as classifying the participants in the different phases of the menstrual cycle.

In conclusion, the present study suggests a possible role of the endometriotic cell itself in maintaining the inflammatory environment of endometriosis and indicates that increased IL-6 protein expression in ectopic tissue could contribute to the elevated levels of this cytokine in PF.

REFERENCES

ABRÃO, M. S. et al. Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected. **Fertil Steril**, v. 94, n. 3, p. 1099-101, Aug 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004387> >.

_____. Tumor markers in endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 66, n. 1, p. 19-22, Jul 1999. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458545> >.

AGIC, A. et al. Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? **Gynecol Obstet Invest**, v. 62, n. 3, p. 139-47, 2006. ISSN 0378-7346. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679772> >.

AKOUM, A. et al. Elevated concentration and biologic activity of monocyte chemoattractant protein-1 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 66, n. 1, p. 17-23, Jul 1996. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752605> >.

_____. Secretion of interleukin-6 by human endometriotic cells and regulation by proinflammatory cytokines and sex steroids. **Hum Reprod**, v. 11, n. 10, p. 2269-75, Oct 1996. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943541> >.

BARCZ, E. et al. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration. **Fertil Steril**, v. 97, n. 6, p. 1380-6.e1, Jun 2012. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542989> >.

BATT, R. E. **A History of endometriosis**. London: Springer 2011.

BEDAIWY, M. A. et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. **Hum Reprod**, v. 17, n. 2, p. 426-31, Feb 2002. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821289> >.

BRAUN, D. P.; DMOWSKI, W. P. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 10, n. 5, p. 365-9, Oct 1998. ISSN 1040-872X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9818213> >.

BRICOU, A.; BATT, R. E.; CHAPRON, C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 138, n. 2, p. 127-34, Jun 2008. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336988> >.

BULUN, S. E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144942> >.

BURNEY, R. O. The genetics and biochemistry of endometriosis. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 25, n. 4, p. 280-6, Aug 2013. ISSN 1473-656X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759832> >.

BURNS, W. N.; SCHENKEN, R. S. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 42, n. 3, p. 586-610, Sep 1999. ISSN 0009-9201. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451772> >.

CARVALHO, L. et al. Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis. **J Minim Invasive Gynecol**, v. 18, n. 4, p. 419-27, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1553-4669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620779> >.

CARVALHO, L. F. et al. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n. 4, p. 1033-40, Oct 2012. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791380> >.

CHRISTODOULAKOS, G. et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'. **Eur J Contracept Reprod Health Care**, v. 12, n. 3, p. 194-202, Sep 2007. ISSN 1362-5187. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17763257> >.

D'HOOOGHE, T. M.; DEBROCK, S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. **Hum Reprod Update**, v. 8, n. 1, p. 84-8, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866244> >.

DANDONA, P. et al. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v. 99, n. 4A, p. 15B-26B, Feb 2007. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307055> >.

DOVEY, S.; SANFILIPPO, J. Endometriosis and the adolescent. **Clin Obstet Gynecol**, v. 53, n. 2, p. 420-8, Jun 2010. ISSN 1532-5520. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436319> >.

EDWARDS, A. K. et al. Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. **J Reprod Immunol**, v. 97, n. 1, p. 85-94, Mar 2013. ISSN 1872-7603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432875> >.

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 217-26, Feb 2002. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866688> >.

GIUDICE, L. C. Clinical practice. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 362, n. 25, p. 2389-98, Jun 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20573927> >.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, 2004 Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.

GROOTHUIS, P. G. et al. Vascular development in endometriosis. **Angiogenesis**, v. 8, n. 2, p. 147-56, 2005. ISSN 0969-6970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211360> >.

GUZEL, A. I. et al. Recurrence factors in women underwent laparoscopic surgery for endometrioma. **Minerva Chir**, v. 69, n. 5, p. 277-82, Oct 2014. ISSN 0026-4733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267018> >.

HARADA, T.; IWABE, T.; TERAOKAWA, N. Role of cytokines in endometriosis. **Fertil Steril**, v. 76, n. 1, p. 1-10, Jul 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438312> >.

HARADA, T. et al. Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 176, n. 3, p. 593-7, Mar 1997. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077612> >.

HORNUNG, D. et al. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 2, p. 163-8, Feb 2001. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160842> >.

JACOBSON, T. Z. et al. Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD001398, 2002. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519555> >.

KALU, E. et al. Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 33, n. 4, p. 490-5, Aug 2007. ISSN 1341-8076. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688616> >.

KATS, R. et al. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 78, n. 1, p. 69-76, Jul 2002. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095493> >.

KEENAN, J. A. et al. Interferon-gamma (IFN-gamma) and interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 32, n. 3, p. 180-3, Oct 1994. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7880401> >.

KENNEDY, S. The genetics of endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 82, n. 2, p. 129-33, Feb 1999. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206402> >.

KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod**, v. 20, n. 10, p. 2698-704, Oct 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980014> >.

KHAN, K. N. et al. Higher activity by opaque endometriotic lesions than nonopaque lesions. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 83, n. 4, p. 375-82, Apr 2004. ISSN 0001-6349. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15005786> >.

LAIRD, S. M.; LI, T. C.; BOLTON, A. E. The production of placental protein 14 and interleukin 6 by human endometrial cells in culture. **Hum Reprod**, v. 8, n. 6, p. 793-8, Jun 1993. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8345065> >.

LASMAR, R. B.; LASMAR, B. P.; PILLAR, C. Diagram to map the locations of endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 118, n. 1, p. 42-6, Jul 2012. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507261> >.

LEBOVIC, D. I.; MUELLER, M. D.; TAYLOR, R. N. Immunobiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 75, n. 1, p. 1-10, Jan 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163805> >.

LEVANDER, G.; NORMANN, P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 34, n. 4, p. 366-98, 1955. ISSN 0001-6349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13301610> >.

MAATHUIS, J. B.; VAN LOOK, P. F.; MICHIE, E. A. Changes in volume, total protein and ovarian steroid concentrations of peritoneal fluid throughout the human menstrual cycle. **J Endocrinol**, v. 76, n. 1, p. 123-33, Jan 1978. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/624877> >.

MALUTAN, A. M. et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. **Cent Eur J Immunol**, v. 40, n. 1, p. 96-102, 2015. ISSN 1426-3912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26155190> >.

MATARESE, G. et al. Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? **Trends Mol Med**, v. 9, n. 5, p. 223-8, May 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763528> >.

MAY, K. E. et al. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 6, p. 651-74, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20462942> >.

MOL, B. W. et al. The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 70, n. 6, p. 1101-8, Dec 1998. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848302> >.

MORSCH, D. M. et al. c-fos gene and protein expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action. **J Mol Histol**, v. 40, n. 1, p. 53-8, Feb 2009. ISSN 1567-2387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19199093> >.

NAP, A. W. et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 3, p. 1089-95, Mar 2004. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001592> >.

_____. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 233-44, Apr 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157640> >.

NÁCUL, A. P. et al. Gene expression of leptin and long leptin receptor isoform in endometriosis: a case-control study. **Obstet Gynecol Int**, v. 2013, p. 879618, 2013. ISSN 1687-9589. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634146> >.

NÁCUL, A. P.; SPRITZER, P. M. [Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 6, p. 298-307, Jun 2010. ISSN 1806-9339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945016> >.

OHATA, Y. et al. Serum interleukin-8 levels are elevated in patients with ovarian endometrioma. **Fertil Steril**, v. 90, n. 4, p. 994-9, Oct 2008. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635170> >.

OHTAKE, H. et al. A novel in vitro experimental model for ovarian endometriosis: the three-dimensional culture of human ovarian surface epithelial cells in collagen gels. **Fertil Steril**, v. 71, n. 1, p. 50-5, Jan 1999. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935115> >.

PAUL DMOWSKI, W.; BRAUN, D. P. Immunology of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 245-63, Apr 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157641> >.

PONCE, C. et al. Nuclear factor kappaB pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis. **Reproduction**, v. 137, n. 4, p. 727-37, Apr 2009. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129371> >.

RAMOS, I. M. et al. Evaluation of CA-125 and soluble CD-23 in patients with pelvic endometriosis: a case-control study. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 1, p. 26-32, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392313> >.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, May 1997. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130884> >.

SALMASSI, A. et al. Differential interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression and its distribution pattern in eutopic and ectopic endometrium. **Fertil Steril**, v. 89, n. 5 Suppl, p. 1578-84, May 2008. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953945> >.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **Am J Pathol**, v. 3, n. 2, p. 93-110.43, Mar 1927. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SCARSELLI, G. et al. Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. **Minerva Ginecol**, v. 57, n. 1, p. 55-78, Feb 2005. ISSN 0026-4784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758866> >.

SENTURK, L. M.; ARICI, A. Immunology of endometriosis. **J Reprod Immunol**, v. 43, n. 1, p. 67-83, May 1999. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392782> >.

SHARMA, I. et al. Implication of the RAGE-EN-RAGE axis in endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 110, n. 3, p. 199-202, Sep 2010. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537326> >.

SMITH, R. E. et al. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. **J Leukoc Biol**, v. 62, n. 5, p. 612-9, Nov 1997. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9365116> >.

SOLNIK, M. J. Chronic pelvic pain and endometriosis in adolescents. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n. 5, p. 511-8, Oct 2006. ISSN 1040-872X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932045> >.

SOMIGLIANA, E. et al. Non-invasive diagnosis of endometriosis: the goal or own goal? **Hum Reprod**, v. 25, n. 8, p. 1863-8, Aug 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519246> >.

SOURIAL, S.; TEMPEST, N.; HAPANGAMA, D. K. Theories on the pathogenesis of endometriosis. **Int J Reprod Med**, v. 2014, p. 179515, 2014. ISSN 2356-7104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25763392> >.

STARZINSKI-POWITZ, A. et al. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology. **Curr Mol Med**, v. 1, n. 6, p. 655-64, Dec 2001. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899254> >.

TAYLOR, R. N. **Classical and neo-classical concepts in the etiology of endometriosis.** 20th World Congress on Fertility and Sterility. Germany: Lukon-Verlagsgesellschaft 2010.

TAYLOR, R. N.; KANE, M. A.; SIDELL, N. Pathogenesis of Endometriosis: Roles of Retinoids and Inflammatory Pathways. **Semin Reprod Med**, v. 33, n. 4, p. 246-56, Jul 2015. ISSN 1526-4564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132929> >.

TSUDO, T. et al. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. **Fertil Steril**, v. 73, n. 2, p. 205-11, Feb 2000. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685516> >.

VERCELLINI, P. et al. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 254-69, Feb 2009. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948311> >.

VERIT, F. F.; AYAS, S. Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. **Fertil Steril**, v. 94, n. 1, p. e31; author reply e32, Jun 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385382> >.

WU, J. T.; WU, L. L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. **Clin Chim Acta**, v. 366, n. 1-2, p. 74-80, Apr 2006. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343470> >.

YANG, W. C. et al. Serum and endometrial markers. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 305-18, Apr 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157644> >.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1: Positive immunostaining of IL-6 in endometrial tissue. Positive staining is indicated by brown color in the cytoplasm of stromal and glandular epithelial cells. **(A)** Expression of weak positivity in the endometrium of women with normal pelvis (control group). **(B,C)** Expression of strong positivity in endometriotic tissue. Original magnification: 40X, 100X.

FIGURE 1

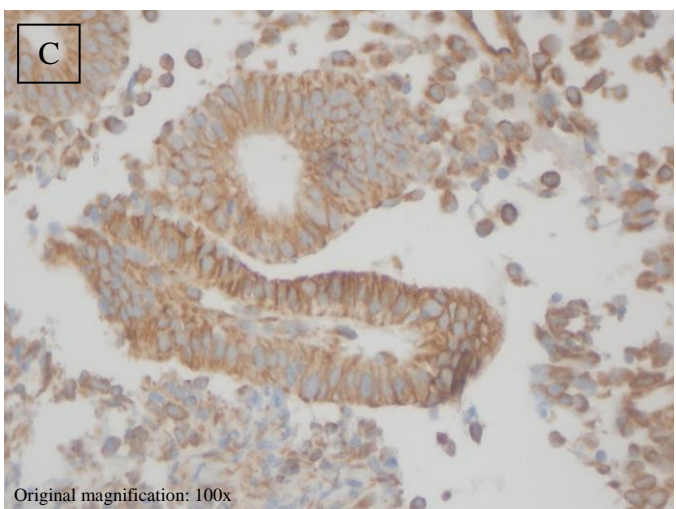
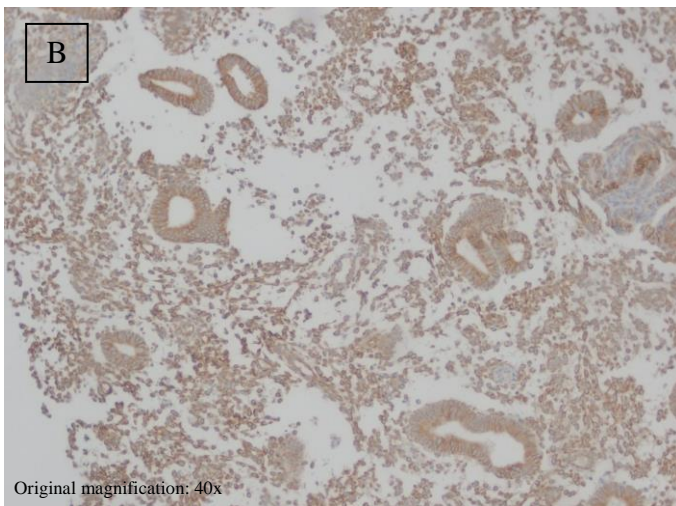
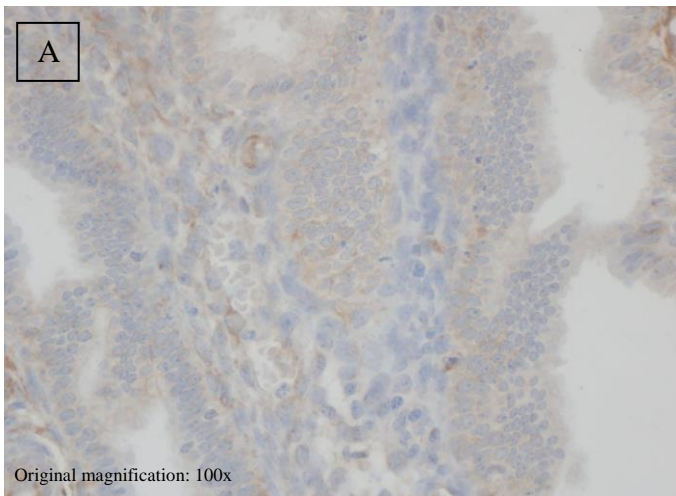


Table 1: Clinical and hormonal characteristics of patients with endometriosis and normal pelvis (control group).

	Control	Endometriosis	<i>P</i>
	n (12)	n (18)	
Age (years)	31.7 ± 6.0	31.1 ± 5.8	0.78
BMI (kg/m²)	24.9 ± 4.6	24.2 ± 5.7	0.72
Estradiol (ng/ml)	75.2 (53,3 – 111.4)	132.5 (67.7 – 185.0)	0.06
Progesterone (ng/ml)	1.1 (0,3 – 8.7)	2.8 (0.5 – 9.8)	0.63
IL-6 in Peritoneal fluid (ng/ml)	23.1 (11.8 – 35.3)	48.2 (36.7 – 89.9)	0.002
Stage of Endometriosis % (n)			
Normal Pelvis	100 (12)	0 (0)	
Minimal or Light	0 (0)	55.6 (10)	
Moderate or Severe	0 (0)	44.4 (8)	
BMI (kg/m²) % (n)			
<25 = Normal	66.7 (8)	62.5 (10)	
25 to 29.9 = Overweight	16.7 (2)	18.8 (3)	0.974
≥30 = Obesity	16.7 (2)	18.8 (3)	

Data presented as mean ± standard deviation (Student t test), median and interquartile range (25-75) (Mann-Whitney) or percentage and absolute number (Chi-square or Fisher's exact).

Table 2: Intensity of IL-6 protein expression by immunohistochemistry in patients with endometriosis and normal pelvis (control group) ($P < 0.05$).

	Control	Endometriosis	
			<i>P</i>
IL-6 positivity % (n)			
Weak	9.1 (1)	0 (0)	
Moderate	54.5 (6)	9.1 (1)	0.028
Intense	36.4 (4)	90.9 (10)	

Data presented as percentage and absolute number (Chi-square).