

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Concentração sérica e peritoneal da interleucina-18 em
mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.**

Autora: Dra. Cristina Luce Glitz

Orientador: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue Cunha Filho

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Concentração sérica e peritoneal da interleucina-18 em
mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.**

Autora: Dra. Cristina Luce Glitz

Orientador: Prof. Dr. João Sabino Lahorgue Cunha Filho

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2006

G561c Glitz, Cristina Luce

Concentração sérica e peritoneal da interleucina-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve / Cristina Luce Glitz ; orient. João Sabino Lahorgue Cunha Filho. – 2006.

94 f. ; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Endometriose 2. Infertilidade feminina 3. Interleucina-18 I. Cunha Filho, João Sabino Lahorgue II. Título.

NLM: WP 390

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Sabino Cunha Filho, idealizador do trabalho, pela excelente orientação prestada.

Prof. Dr. Fernando Monteiro de Freitas, pelo incentivo e exemplo profissional.

A Dra. Carmen Pilla pelo tempo dispensado com auxílio e orientações.

A Marta Senger pelo auxílio na realização do trabalho.

A bolsista Juliana Azevedo pelo auxílio e dedicação.

Aos médicos residentes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio e amizade.

Ao Ricardo

pelo carinho, amor e apoio constantes.

Aos meus pais – Alfredo e Heloisa

pelo incentivo, exemplo e otimismo sempre.

Aos meus irmãos – Fernanda e Eduardo

pelo carinho e compreensão.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	07
2.Revisão da literatura.....	09
2.1.Aspectos hormonais na endometriose.....	09
2.2. Hormônios e modulação imunológica.....	12
2.3. Alterações imunológicas no fluido peritoneal.....	14
2.4. Interleucina – 18 (IL-18).....	18
3. Objetivos.....	22
4. Referências bibliográficas.....	23
5. Interleukin-18 is not associated to infertility in women with minimal or mild endometriosis.....	30
6. Interleucina-18 não está associada à infertilidade em mulheres com endometriose mínima ou leve	47
7. Conclusões.....	66
8. Perspectivas.....	67
9. Anexos.....	68

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

1. Table 1: Results of IL-18 dosages in the peritoneal and serum fluid and hormonal measurements in the peritoneal fluid (expressed as means and standard deviation).....	41
2. Table 2: Comparison among IL-18 and endometriosis studies.....	42
3. Figure 1: Correlation of serum IL-18 levels and peritoneal IL-18 levels.....	43
4. Tabela 1: Resultados das dosagens de IL-18 no fluido peritoneal e sérica e das dosagens hormonais no fluido peritoneal, médias e desvio padrão.....	60
5. Tabela 2: comparação entre os estudos com IL-18 e endometriose.....	61
6. Figura 1 : Correlação de IL-18 sérica e peritoneal.....	62

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença benigna comum entre mulheres em idade reprodutiva e caracteriza-se pela presença e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina. Embora a endometriose permaneça como uma das patologias ginecológicas mais investigadas, sua etiologia e patogênese ainda não estão bem esclarecidas. Existem algumas teorias que tentam explicar sua etiologia, entre elas implantes ectópicos, metaplasia celômica e teoria da indução (Nisolle, 1997; Starzinski-Powitz, 1998; Olive, 2001; Freitas, 2006).

A teoria da menstruação retrógrada tem sido largamente aceita e seu mecanismo explicaria a presença de tecido endometrial em locais ectópicos. No entanto, essa teoria não explica a presença de endometriose em alguns locais como sistema nervoso central, sistema respiratório, entre outros. Além disso, cerca de 90% das mulheres que menstruam apresentam menstruação retrógrada, e, no entanto, apenas 10% têm endometriose (Valle, 2002).

Em torno de 40% das pacientes com endometriose serão assintomáticas (Freitas, 2001). Naquelas sintomáticas, o sintoma mais comum é a dor pélvica, que geralmente é cíclica, e pode irradiar-se para membros inferiores ou para região lombar, algumas pacientes se queixam de dispareunia profunda e dismenorréia (Valle, 2002). Acredita-se que a dor pélvica esteja relacionada com reação inflamatória originada em implantes peritoneais pela liberação de prostaglandinas (Olive, 2001; Harada, 2001; Dmowski, 2004).

O tempo para o diagnóstico definitivo de endometriose pode ser considerado longo, principalmente em mulheres jovens e adolescentes com dor pélvica, onde

ocorre um atraso no diagnóstico considerando-se o início da sintomatologia (Arruda, 2003).

No Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a endometriose foi o principal achado laparoscópico em pacientes com dor pélvica e o segundo diagnóstico entre aquelas com infertilidade (Palma Dias, 1995).

A associação de endometriose e infertilidade já é bastante estudada. Sabe-se que até 60% das pacientes com infertilidade podem apresentar implantes endometrióticos. Pacientes com endometriose moderada ou severa (com alteração anatômica importante) apresentam infertilidade secundária à causa anatômica. Entretanto, para aquelas mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve a causa da infertilidade não está totalmente esclarecida, envolvendo alterações hormonais, imunológicas, proliferativas (endometriais) e uterinas (Muse, 1982; Bancroft, 1989; Mahutte, 2001; Valle, 2002).

O estudo da etiologia da dor pélvica em mulheres que apresentam endometriose também tem sido bastante investigado por inúmeros autores. A classificação proposta pela American Society for Reproductive Medicine (ASRM, atualizada, 1996) não associa os diferentes estádios da doença com a sintomatologia. Atualmente, a teoria mais aceita para a presença de dor neste grupo de pacientes seria uma alteração inflamatória local, com expressão de fatores imunológicos (citoquinas) (Harada, 2001; Valle, 2002), ou a incitação de terminais nervosos em implantes mais profundos (Berkley, 2005).

Alguns marcadores séricos têm sido estudados para o auxílio no diagnóstico e manejo da endometriose. Entre eles, o CA-125 que estaria presente no soro de

pacientes com endometriose severa no início do ciclo menstrual. O amilóide A sérico (SAA) também pode estar associado em casos severos de endometriose e o anticorpo anticardiolipina (aCL) seria encontrado em todos os estágios da doença (Abrão, 1997).

A identificação de um manejo não cirúrgico leva pesquisadores a estudarem a fisiopatologia da endometriose. Existem amplas evidências sugerindo que o sistema imunológico seria um dos responsáveis e a resposta imune alterada explicaria porque algumas mulheres desenvolvem endometriose e outras não (Bedaiwy, 2002). Um conceito importante seria relacionado a um processo inflamatório pélvico provavelmente alterando a imunidade celular no fluido peritoneal. Vários estudos têm demonstrado que os componentes imunológicos do fluido peritoneal de pacientes com endometriose teriam papel essencial na patogênese e progressão da doença (Harada, 2001; Mahutte, 2002; Kyama, 2003; Dmowski, 2004).

Portanto, existem várias teorias que tentam explicar e associar os aspectos hormonais e imunológicos da endometriose com a sintomatologia álgica ou com a dificuldade para gestar. Entretanto, até o presente momento, nenhum resultado foi definitivo ou conclusivo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos hormonais na endometriose

Alterações hormonais foram descritas por vários autores em diferentes estudos, tentando relacionar as alterações existentes e a incapacidade de gestar das pacientes com endometriose. Foram encontradas, por exemplo, anormalidades na secreção de progesterona, estradiol, prolactina e na função lútea das pacientes

inférteis com endometriose, porém os achados são conflitantes (Burns, 1999; Cunha-Filho, 2001; Valle, 2002).

A endometriose foi associada com anovulação em 17% das pacientes mediante um escore obtido de suas anamneses (Soules, 1976; Dmowski, 1994). O estigma ovulatório foi observado em 33% das pacientes inférteis com endometriose e esses autores acreditam haver alguma alteração hormonal em pacientes com endometriose. Outros estudos, comparando pacientes com e sem endometriose, observaram uma prevalência superior de folículo não roto em pacientes com endometriose (Mio, 1992). Em estudo experimental, com ratas, sugere-se a associação de endometriose e infertilidade com uma foliculogênese alterada (Moon, 1993). Destacam-se a associação de endometriose com anovulação, galactorréia, síndrome de folículo não roto, secreção anômala de prolactina e insuficiência lútea (Muse, 1982).

A síndrome do folículo não roto que pode estar associada a endometriose leva o corpo lúteo a produzir e secretar uma menor quantidade de progesterona podendo acarretar uma disfunção lútea (Bancroft, 1992; Koninckx, 1980).

Pacientes com endometriose teriam secreção anômala do hormônio luteinizante (LH) (Cheesmen, 1982), o que contribuiria para o fato de que a insuficiência lútea é mais prevalente em mulheres inférteis com endometriose do que naquelas com causa desconhecida (Cheesman, 1983). No entanto, outros autores não verificaram diferença significativa na prevalência de insuficiência lútea em pacientes com endometriose (Matorras, 1985). Nessas mulheres também se encontra diminuição da concentração de progesterona, tanto na sua concentração sérica como aquela encontrada no líquido peritoneal (Barry-Kinsella, 1994). A

alteração na secreção de estradiol e progesterona pode ser alguma das alterações hormonais de pacientes com endometriose mínima (Tummon, 1988).

A presença da associação entre endometriose, hiperprolactinemia e insuficiência lútea foi descrita como possível causa de infertilidade no grupo de pacientes com essa doença e sem dano tubário, por uma provável disfunção ovulatória (Cunha-Filho, 2001). Nosso grupo observou que pacientes com endometriose mínima e leve apresentam alterações na fase folicular precoce caracterizada pela diminuição dos níveis séricos de estradiol bem como pela prevalência de hiperprolactinemia e insuficiência lútea. Pacientes com endometriose mínima e leve também teriam uma alteração na secreção de prolactina após estímulo com hormônio tireotrófico (TRH), o que pode caracterizar um estado de hiperprolactinemia oculta (Cunha-Filho, 2000, 2001).

Outro estudo do nosso grupo mostrou que pacientes inférteis com endometriose moderada ou severa apresentam níveis diminuídos da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (Insulin-like growth factor binding protein-1 - IGFBP-1) no fluido folicular quando submetidas à fertilização *in vitro* (Cunha-Filho, 2003).

Recente meta-análise que incluiu 22 estudos mostra que pacientes com infertilidade associada a endometriose quando submetidas à fertilização *in vitro* apresentam diminuição significativa dos processos reprodutivos, com uma taxa de gestação 20% inferior do que naquelas que realizaram fertilização *in vitro* por outras indicações. Os dados sugerem que o efeito da endometriose não seria exclusivamente pela receptividade do endométrio, mas também por desenvolvimento do oócito e do embrião (Barnhart, 2002).

2.2 Hormônios e modulação imunológica

As citocinas interagem e podem modular a esteroidogênese glandular (adrenais, testículos e ovários), influenciando as funções e o desenvolvimento dessas glândulas de uma maneira sistêmica e complexa (Emre, 2003; Bosrnstein, 2004).

As glândulas adrenais, especificamente as células adrenocorticais, produzem uma variedade de citocinas, como fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$), interleucina-1 (IL-1), e RNA mensageiro de interleucina-6 (IL-6) (Gonzalez-Hernandez, 1994, 1996). O RNA mensageiro de IL-1 e IL-6 é expresso predominantemente na zona reticular, mas também na produção celular de esteróides dentro da medula e em outras zonas do córtex (Gonzalez-Hernandez, 1994). A interleucina-18 (IL-18) tem sido encontrada em células da zona reticular e da zona fasciculada do córtex adrenal e estimula a imunidade celular. A produção de RNA mensageiro de IL-18 pelas células adrenocorticais é promovida pelo estresse agudo e sugere-se que a IL-18 tenha um papel imuno-estimulatório durante situações de estresse (Conti, 2000; Sugama, 2000).

O corpo lúteo produz progesterona, o que permite a manutenção de uma gestação. No entanto, se não existe embrião, o corpo lúteo degenera e propicia o crescimento de novos folículos. Existem células imunológicas dentro do corpo lúteo (macrófagos e linfócitos T), especialmente durante a luteólise. Os macrófagos têm papel na ingestão de remanescentes celulares que resultam da morte de células lúteas. Acredita-se que as células imunes influenciem diretamente a destruição de células lúteas e a diminuição da esteroidogênese (Bornstein, 2004). A inibição das

células imunes no corpo lúteo durante a gestação inicial pode ser derivada de sinais uterinos ou embriônicos, ou pela manutenção de altas concentrações de progesterona dentro do tecido luteal (Pate, 2001).

De outra maneira, TNF e IL-1 inibem a esteroidogênese de células ovarianas indiferenciadas pela inibição de adenil-ciclase. Em ovários diferenciados, essas citocinas estimulam a síntese de progesterona ou tem pequeno efeito na esteroidogênese (Terranova, 1997).

Outro estudo demonstra que o endométrio humano normal quando primariamente exposto a progesterona, atua na regulação da expressão de metaloproteinases (MMP) e também limita a habilidade das citocinas para estimular a expressão dessas enzimas. Em contraste, o tecido endometrial de mulheres com endometriose demonstra uma resposta alterada a progesterona, permitindo a expressão contínua de MMPs através da fase secretória. Mais especificamente, as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células epiteliais endometriais opõem-se às respostas das células estromais a progesterona inibindo a produção de fatores de diferenciação importantes para a regulação celular das MMPs (Osteen, 2005).

Horie pela primeira vez demonstra que a progesterona e componentes progesteronais atenuam a expressão de interleucina-8 (IL-8) pela redução da ativação de fator nuclear kappa B (NF- κ B) induzida pelo TNF- α nas células endometrióticas estromais, sugerindo um possível mecanismo molecular na terapia hormonal para o controle da progressão da endometriose (Horie, 2005).

Outro estudo sugere que além de outros mediadores inflamatórios, os esteróides ovarianos também participam da produção de fator de crescimento hepatocitário (HGF) pelos macrófagos peritoneais que podem estar envolvidos no

desenvolvimento de endometriose tanto isoladamente como em associação com estrógeno (Khan, 2005).

Fica bem evidente e demonstrada a interação entre a ação dos esteróides ovarianos e sua imunomodulação durante o ciclo menstrual e mesmo durante a gestação (Emre, 2003). Alterações hormonais poderiam alterar a expressão de diversas rotas imunológicas, alterando também a inter-relação do sistema imunológico e comprometendo o processo reprodutivo.

2.3 Alterações imunológicas no fluido peritoneal

O fluido peritoneal normalmente contém inúmeras células, incluindo macrófagos, células mesoteliais, linfócitos, eosinófilos e mastócitos. Em torno de 85% dos leucócitos no fluido peritoneal são macrófagos (Harada, 2001). Os macrófagos são encontrados na cavidade peritoneal e em vários compartimentos do corpo. Originam-se a partir dos monócitos circulantes que ao entrarem nessa cavidade diferenciam-se em macrófagos. Uma das funções prováveis dos macrófagos no trato reprodutivo estaria relacionada à menstruação retrógrada, onde removeriam as células menstruais. Considerando-se a importância da menstruação retrógrada na patogênese da endometriose e a função dos macrófagos e outros leucócitos na manutenção da homeostasia da cavidade peritoneal, vários estudos têm relatado a função dessas células na endometriose (Burns, 1999, Berkknoglu, 2003).

O fluido peritoneal, geralmente visualizado na cavidade pélvica durante exames ou cirurgias ginecológicas de mulheres com endometriose, contém um número aumentado de macrófagos ativados que secretam vários produtos locais, como fatores de crescimento e citocinas. Estudos têm encontrado níveis elevados de inúmeras citocinas no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, implicando então essas

citoquinas no desenvolvimento e progressão da endometriose e da infertilidade (Harada, 2001, Kyama, 2003).

Outros autores também acreditam que a ativação de macrófagos peritoneais seria a contribuição central na patogênese da endometriose. Macrófagos ativados na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose são potentes produtores de citoquinas (Halme, 1984).

As citoquinas são proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas que podem ser sintetizadas pelos macrófagos peritoneais, linfócitos, implantes endometriais ectópicos ou células mesoteliais do peritônio (Kyama, 2003). Desempenham papel importante na regulação da proliferação, ativação, motilidade, adesão, quimiotaxia e morfogênese celular. São fundamentais na iniciação, propagação e regulação da resposta inflamatória e imunológica (Bedaiwy, 2002).

Algumas citoquinas têm sido identificadas no fluido peritoneal por ensaios altamente sensíveis. As citoquinas encontradas em mulheres com endometriose incluem, até o presente momento: IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, interferon- γ , fator de necrose tumoral (TNF) entre outros (Harada, 2001; Bedaiwy, 2002; Wu, 2003). A expressão anormal de inúmeras citoquinas pela ativação de macrófagos, como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF, no fluido peritoneal de mulheres com endometriose quando comparadas ao grupo controle, pode contribuir para um envolvimento peritoneal, favorecendo a implantação de células endometriais e o estabelecimento da endometriose (Kyama, 2003). As citoquinas podem regular a ação de leucócitos no fluido peritoneal ou agir diretamente no endométrio ectópico, onde podem exercer vários papéis na patogênese e fisiopatologia da endometriose.

Citoquinas como a IL-8 e $TNF\alpha$ conhecidamente promovem a proliferação de células endometriais, adesão endometrial e angiogênese. Não somente os macrófagos peritoneais, mas também as lesões endometrióticas e as células mesoteliais do peritônio podem secretar citoquinas como $TNF\alpha$ e IL-1 em mulheres com endometriose. Essas citoquinas por sua vez modulam o estímulo de outras citoquinas, como a IL-8, promovendo então essa proliferação celular que pode facilitar os implantes endometrióticos ou promover uma alteração no fluido peritoneal (Kyama, 2003).

Estudos recentes sugerem que os implantes endometrióticos também produzem citoquinas. A IL-6 é secretada por vários tipos de células, incluindo células epiteliais endometriais, macrófagos e leucócitos. Quando a produção de IL-6 por macrófagos e células estromais endometrióticas em pacientes com endometriose é comparada, observam-se níveis similares de produção de IL-6 pelas células estromais (derivadas de um endometrioma) e por macrófagos estimulados pelo $TNF\alpha$. Esses achados sugerem que o tecido endometriótico pode ser outra fonte importante dessa citoquina mantendo o processo inflamatório (Harada, 2001).

Para desenvolverem-se, as células endometriais precisam estabelecer interações célula-célula ou célula-matriz extracelular com a superfície peritoneal. Estudo recente mostrou que as células do estroma endometrial são as células críticas na ligação do endométrio com a superfície peritoneal. A IL-8 pode desempenhar papel na ligação dos implantes endometriais na patogênese da endometriose. Em modelos experimentais onde se aumenta a concentração de IL-8 estimula-se a capacidade das células do estroma endometrial em aderir a matriz extracelular (Harada, 2001).

Tem sido avaliada a possibilidade de que a qualidade das células endometriais viáveis no fluido peritoneal de mulheres com endometriose pode ser diferente daquelas com pelve normal. As citocinas inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, IL-8 e IL-6) produzidas pelas células endometriais provavelmente contribuem para o processo de adesão celular. A IL-8 parece estimular a adesão de células endometriais à fibronectina. O TNF também promoveria proliferação de estroma endometrial *in vitro* e adesão do estroma celular endometrial aos componentes da matriz extracelular (Kyama, 2003).

Ainda não está claro se as alterações imunológicas são causa ou consequência da endometriose. A endometriose levaria a uma alteração inflamatória causada por uma resposta imunológica alterada e exagerada? Ou a endometriose seria causada por uma resposta inflamatória peritoneal alterada? Até o presente momento ainda não temos dados suficientes para responder de forma adequada a essas questões.

Existem estudos com babuínos tentando encontrar alguma resposta. Nesses estudos, as evidências sugerem que a resposta inflamatória peritoneal seria uma consequência e não uma causa da endometriose (Kyama, 2003). Nos babuínos, tanto a menstruação retrógrada espontânea como a injeção experimental intrapélvica de células endometriais foram associadas com inflamação pélvica (aumento do volume de fluido peritoneal e aumento da concentração de leucócitos e citocinas inflamatórias). Esse efeito inflamatório peritoneal foi observado um mês após a injeção intrapélvica de endométrio, mas desaparece após dois ou três meses. Demonstrou-se também que a concentração de leucócitos e a proporção de macrófagos e células T citotóxicas estão aumentadas no fluido peritoneal de babuínos com endometriose espontânea (D'Hooghe, 1996, 1999, 2001, 2002).

Mesmo a resposta inflamatória sendo uma consequência da endometriose, a coexistência de endometriose e resposta inflamatória peritoneal pode oferecer novas opções terapêuticas no tratamento da endometriose.

2.4 Interleucina-18

A IL-18 é uma citocina que pertence à família da interleucina 1 (Okamura, 1998; Dinarello, 1999, Gracie, 2003), originariamente identificada como interferon-gama (IFN- γ) nas células de Kupffer e macrófagos. Similar a IL-1-beta, a IL-18 é sintetizada como um precursor biológico inativo, que requer clivagem para uma forma ativa. A ativação da IL-18 madura está diretamente relacionada a IL-1. Atualmente a IL-18 é reconhecida como importante regulador da resposta imune inata e adquirida. Desde então, as funções imunológicas da IL-18 têm sido estudadas. Ela pode ativar células Natural Killer (NK) e apresentar também papel importante na proteção contra infecções bacterianas. Tem papel central na cascata da inflamação e no processo de imunidade inata e adquirida em função de sua habilidade de induzir a produção de IFN- γ em linfócitos T e células NK (Dinarello, 1999; Akinori, 2000; Sims, 2002). A IL-18 atua em sinergia com IL-12 para promover o desenvolvimento da resposta T helper (Liew, 2003). No entanto, não existem informações conclusivas disponíveis sobre as funções da IL-18 no sistema endócrino e reprodutivo.

O aumento da expressão da IL-18 tem sido relatado nas placas ateroscleróticas, mediando a liberação local de INF- γ . Foi realizado um estudo prospectivo com 1229 pacientes com doença arterial coronariana documentada onde dosaram a concentração sérica de IL-18 e outros marcadores de inflamação. A

concentração sérica média de IL-18 estava significativamente aumentada em pacientes que tiveram evento cardiovascular fatal quando comparado com aqueles que não tiveram evento fatal. Identificando, então, a IL-18 como um fator preditor independente de morte cardiovascular em pacientes com doença coronariana (Blankenberg, 2002).

Outro estudo avaliou a IL-18 durante a gestação. Foram obtidas dosagens séricas de IL-18 de 143 pacientes com gestação normal antes do trabalho de parto, 13 mulheres com gestação complicada, 62 mulheres durante trabalho de parto e 29 mulheres no terceiro dia do puerpério de parto normal. Não houve diferença nas dosagens de IL-18 nos diferentes momentos da gestação. A IL-18 mostrou-se marcadamente elevada em mulheres com dor durante o trabalho de parto do que naquelas com contrações sem dor. Quando inicia o trabalho de parto os níveis de IL-18 aumentam significativamente. Os níveis mais elevados de IL-18 também foram encontrados nas gestações com algum tipo de complicação obstétrica (Akinori, 2000).

A IL-18 também foi encontrada no endométrio humano. Um estudo avaliou a presença de IL-18, receptor de IL-18 e proteína ligadora da IL-18 no endométrio humano através de cultura de células epiteliais e estromais do endométrio. A IL-18 apareceu em todas as fases do ciclo menstrual. Os autores acreditam que esse achado esteja relacionado a proteção endometrial contra microorganismos patogênicos e como mecanismo regulatório no controle da invasão trofoblástica através da modulação de citocinas (Yoshino, 2001).

Existem atualmente três estudos publicados que associam a concentração de IL-18 no fluido peritoneal com endometriose. Esses trabalhos mostram resultados diferentes e discordantes.

Alguns autores realizaram um estudo avaliando a concentração da IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose. Foram obtidas amostras de fluido peritoneal de 50 mulheres com endometriose não tratada que realizaram laparoscopia por dor pélvica ou infertilidade, 8 mulheres com endometriose em tratamento com agonista GnRH e 18 controles com pelve normal que realizaram cirurgia para ligadura tubária. A IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose tratada foi significativamente maior do que no grupo controle. A alteração estava presente em todas as fases do ciclo menstrual. Os níveis de IL-18 em mulheres com implantes endometrióticos superficiais e profundos estavam significativamente elevados quando comparados com aquelas com endometriomas ovarianos (Arici, 2003).

Outro estudo relacionou a IL-18 com a patogênese da endometriose. Foram avaliadas 39 pacientes com endometriose e 15 mulheres sem endometriose (grupo controle). Foi realizada dosagem de IL-18 e de receptor de IL-18 nos tecidos endometrióticos através de análise imuno-histoquímica. Houve elevação significativa de IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose quando comparadas com o grupo controle. As alterações encontradas na avaliação imuno-histoquímica sugerem fortemente que a IL-18 tem papel na patogênese da endometriose. (Oku, 2004).

Entretanto, Zhang em 2004 determinou a concentração de IL-18 no fluido peritoneal e no soro de mulheres com endometriose e comparou com grupo controle. O estudo avaliou 44 mulheres que realizaram laparoscopia para patologias ginecológicas benignas (22 pacientes que realizaram ligadura tubária e 22 mulheres com diagnóstico de endometriose em diferentes estágios). A concentração de IL-18 no fluido peritoneal e sérica foi correlacionada com a presença de endometriose, estágio da doença e fase do ciclo menstrual. A concentração peritoneal de IL-18 estava significativamente mais baixa em pacientes com endometriose do que no grupo sem endometriose. A concentração sérica de IL-18 não apresentou diferença entre os

grupos. Não houve correlação da IL-18 com o estágio da endometriose e fase do ciclo menstrual, tanto no fluido peritoneal quanto no soro (Zhang, 2004).

Os três estudos descritos acima utilizaram diferentes kits para dosagem de IL-18 (Bender Medsystems, Sta Cruz Biotechnology e MBL, Co.), esse poderia ser um dos motivos para a diferença entre os resultados apresentados por esses autores. Os valores numéricos apresentados são bastante distintos, embora a técnica empregada seja a mesma (ELISA).

Um outro fator importante a ser levado em consideração é a composição do grupo de pacientes em que foi realizada a dosagem de IL-18. Sabe-se que a escolha das pacientes pode interferir bastante no resultado final, principalmente quando trabalhamos com métodos e técnicas novas e com grande variabilidade. Um dos trabalhos realizados utilizou pacientes que já haviam tratado endometriose com agonista GnRH, podendo esse tratamento apresentar alguma interferência sobre os resultados. A dor pélvica também não foi considerada ao serem distribuídos os grupos. Ainda não sabemos se aquelas pacientes que apresentam dor pélvica somente pela endometriose, mesmo sendo pacientes férteis, apresentariam alterações no fluido peritoneal. Até o momento, não existem trabalhos que associem somente pacientes com dor pélvica e IL-18.

Sabe-se que existe uma inequívoca correlação entre endometriose e sistema imunológico, bem como com o sistema endocrinológico; além disso, os dados na literatura são escassos e contraditórios. Teoricamente, a IL-18 por fazer parte do grupo das interleucinas 1, pode apresentar uma correlação com o sistema hormonal e exercer papel na imunomodulação. Por esses motivos sugerimos a realização da pesquisa descrita a seguir.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo principal

Avaliar as concentrações sérica e peritoneal de IL-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima e leve.

3.2 Objetivos secundários

Avaliar a concentração peritoneal de prolactina, progesterona e estradiol em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.

Correlacionar as dosagens peritoneais de prolactina, progesterona e estradiol com as concentrações sérica e peritoneal de IL-18.

Correlacionar as concentrações sérica e peritoneal de IL-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.

4. Referências Bibliográficas

- Abrão, M; Padgaec, S; Filho, B; Ramos, L; Pinotti, JA; Oliveira, R. – The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Human Reprod*, 12 (11): 2523-2527, 1997.

- Akinori, I; Yosshiyuki T; Junko, M; Riichiro, K; Yuko, N; Susumu, A; Haruki, O; Koji, K. – IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *Journal Reprod. Immunol*, 47: 65–74, 2000.

- Arici, A; Matalliotakis, I; Goumenou, A; Koumantakis, G; Vassiliadis, S; Mahutte, N. – Altered expression of interleucin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 80 (4): 889-894, 2003.

- Arruda, M; Petta, C; Abrão, M; Benetti-Pinto, C. – Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of brazilian women. *Human Reprod*, 18 (4): 756-759, 2003.

- Ayers, J; Birenbaum, D; Menon, K. - Luteal phase dysfunction in endometriosis: elevated progesterone levels in peripheal and ovarian veins during the follicular phase. *Fertil Steril*, 47 (6): 925-929, 1987.

- Bancroft, K; Williams, C; Elstein, M. - Minimal / mild endometriosis and infertility. A review. *Brit J Obstet Gynecol*, 96: 454-60, 1989.

- Bancroft, K; Williams, C; Elstein, M. - Pituitary-ovarian function in women with minimal or mild endometriosis and otherwise unexplained infertility. *Clin. Endocrinol*, 36: 177-181, 1992.

- Barnhart, K; Dunsmoor-Su, R; Coutifaris, C. – Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 77 (6), 1148-55, 2002.

- Barry-kinsella, C; Sharma, S; Cattel, E; Harrison, R. - Mild to late luteal phase steroids in minimal stage endometriosis and unexplained infertility. *Eur J. Obst Gynecol Reprod Biol*, 54: 113-118, 1994.

- Bedaiwy, M; Falcone, T; Sharma, R; Goldberg, J; Attaran, M; Nelson, D; Agawal, A. - Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Human Reprod*, 17 (2): 426-431, 2002.
- Berkkanoglu, M; Arici, A. – Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 50 (1): 48-59, 2003.
- Berkley, K; Rapkin, A; Papka, R. – The pains of endometriosis. *Science*, 308, 1587-1589, 2005.
- Blankenberg, S; Laurence, T; Bickel, C; Peetz, D; Cambien, F; Meyer, J; Rupprecht, H. - Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*, 106: 24-30, 2002.
- Bornstein, SR; Rutkowski, H; Vrezas, I. – Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinol*, 215; 135-141, 2004
- Burns, W; Schenken, R. – Pathophysiology of endometriosis – Associated infertility. *Clinical Obstet and Gynecol*, 42 (3): 586-610.
- Cheesman, K; Bem-Nun, I; Chatterton, R; Cohen, M. – Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*, 38 (5): 542-548, 1982.
- Cheesman, K; Cheesman, S; Chatterton, R; Cohen, M. – Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. *Fertil Steril*, 40 (5): 590-595, 1983.
- Conti, B; Sugama, S; Kim, Y; Tinti, C; Kim, H; Baker, H; Volpe, B; Attardi, B; Joh, T. – Modulation of IL-18 production in the adrenal cortex following acute ACTH or chronic corticosterone treatment. *Neuroimmunomodul* 8(1), 1-7, 2000
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Brandelli, A; Castilhos, M; Passos, E. – Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*, 33: 216-220, 2001.
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Dias, E; Vettori, D; Souza, C. – Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin – releasing hormone infusion and

dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal / mild endometriosis. Human Reprod, 17 (4): 960-965, 2002.

- Cunha-Filho, JS; Lemos, NA; Freitas, FM; Kiefer, K; Faller, M; Passos, EP. – Insulin like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein -1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. Human Reprod, 18 (2): 423-428, 2003.

- Dinarello, CA. – Interleukin-18. Methods, 19 (1): 121-132, 1999.

- Dinarello, Ca. – IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J Allergy Clin Immunol, 103 (1): 11-24, 1999.

- D' Hooghe, TM; Bambra, CS; Raeymaekers, BM; Koninckx, PR. – Increased prevalence na recurrence of retrograde menstruation in baboons with spontaneous endometriosis. Human Reprod, 11 (9): 2022-2025, 1996.

- D' Hooghe, TM; Bambra, CS; Raeymaekers, Hill, JA. – Pelvic inflammation induced by diagnostic laparoscopy in baboons. Fertil Steril, 72 (6): 1134-1141, 1999.

- D' Hooghe, TM; Bambra, CS; Xiao, L; Peixe, K; Hill, JA. – Effect of menstruation and intrapelvic injection of endometrium on inflammatory parameters of peritoneal fluid in the baboon (*Papio anúbis* and *Papio cynocephalus*). Am J Obstet Gynecol, 184 (5): 917-925, 2001.

- D' Hooghe, TM; Debrock, S. – Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and baboons. Human Reprod Update, 8 (1): 84-88, 2002.

- Dmowski, WP; Rao, P; Scommegna, A. – The luteinized unrupture follicle syndrome and endometriosis. Fertil Steril, 33 (1): 30-34, 1980.

- Dmowski, WP; Gebel, H; Braun, D. – The role of cell-mediated immunity in pathogenesis of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand, 159: 7-14, 1994.

- Dmowski, WP; Braun, D. – Immunology of endometriosis. Best practice & Research Clin Obstet Gynecol, 18 (2), 245-263, 2004.

- Emre, S; Arici, A. – Endometriosis: Interaction of immune and endocrine systems. Semin Reprod Med, 21: 135-144, 2003.

- Freitas, F; Menke, CH; Rivoire, W; Passos, EP. – Rotinas em Ginecologia, 5º edição, ArtMed, 2006.

- Gonzalez-Hernandez, JA; Bornstein, SR; Ehrhart-Bornstein, M; Spath-Schwalbe, E; Jirikoski, G; Scherbaum, WA. – Interleucín-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland *in vivo*: a new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (5), 1492-1497, 1994.

- Gonzalez-Hernandez, JA; Ehrhart-Bornstein, M; Spath-Schwalbe, E; Scherbaum, WA; Bornstein, SR. – Human adrenal cells express tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (2), 807-813, 1996.

- Gracie, JÁ; Robertson, SE; McInnes, IB. – Interleukín-18. *J Leukoc Biol*, 73 (2): 213-224, 2003.

- Harada, T; Iwabe, T; Terakawa, N. - Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril*, 76 (1): 1-10, 2001.

- Horie, S; Harada, T; Mitsunari, M; Taniguchi, F; Iwabe, T; Terakawa, N. – Progesterone and progestational compounds attenuate tumor necrosis factor α -induced IL-8 production via nuclear factor κ B inactivation in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril*, 83(5), 1530-1535, 2005.

- Hsieh, Y; Chang, C; Tsai, F; Hsu, C; Lin, C; Tsai, C. – Interleucín-2 receptor β (IL-2R β) – 627* C homozygote but not IL-12R β 1 codon 378 or IL-18 105 polymorphism is associated with higher susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*, 84 (2): 510-512, 2005.

- Khan, KN; Masuzaki, H; Fujishita, A; Kitajima, M; Sekine, I; Matsuyama, T; Ishimar, T. – Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Human Reprod*, 20 (7), 2004-2013, 2005.

- Koninckx, P; Ide, P; Vandenbroucke, W; Brosens, I. – New aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. *J Reprod Med*, 24 (6): 257-260, 1980.

- Kyama, CM; Debrock, S; Mwenda, JM; D Hooghe, TM. – Potencial involvement of the immune system in the development of endometrisis. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:123, 2003.

- Leyendecker, G; Kunz, G; Herbetz, M; Mall, G. – Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Human Reprod Update*, 4 (5): 752-762, 1998.

- Liew, FY. – The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol Letters*, 85: 131-134, 2003.

- Mahutte, NG; Arici, A. – New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *Journal Reprod Immunol*, 55: 73-83, 2002.

- Marcoux, S; Maheux, R; Berube, S. – Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild andometriosis. *New England J Méd*, 337 (4): 217-222, 1997.

- Matorras, R; Rodíques, F; Pijoan, JI; Ramón, O; Terán, G; Rodríguez-Escudero, F. – Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*, 63 (1): 34-38, 1995.

- Matorras, R; Rodriguez, F; Pérez, C; Pijoan, J; Neyro, J; Rodriguez-Escudero, F. – Infertile woman with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions. *Acta Obst Gynecol Scand*, 75: 826-831, 1996.

- Mio, Y; Toda, T; Harada, T; Terakawa, N. – Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 167: 271-273, 1992.

- Moon, C; Bertero, M; Curry, T; London, S; Muse, K; Sharpe, K; Vernon, M. - The presence of luteinized unruptured follicle syndrome and altered folliculogenesis in rats with surgically induced endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 169:676-82,1993.

- Muse, K; Wilson, E. - How does mild endometriosis cause infertility? *Fertil. Steril*, 38: 145-152, 1982.

- Muse, K; Wilson, E; Jawad, M. - Prolactin hyperstimulation in response to thyrotropin-releasing hormone in patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 38: 419-422, 1982.

- Okamura, H; Tsutsui, H; Kashiwamura, S; Yashimoto, T; Nakanishi, K. – Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol*, 70: 281-312, 1998.

- Oku, H; Tsuji, Y; Kashiwamura, S; Adachi, S; Kubota, H; Okamura, H; Koyama, K. – Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Human Reprod*, 19 (3), jan. 2004.

- Olive, DL; Pritts, E. – Treatment of endometriosis. *New England J Méd*, 345 (4): 266-275, 2001.

- Osteen, KG; Bruner-Tran, KL; Eisenberg, E. – Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril*, 83(3), 529-537, 2005

- Palma Dias, R; Brugnara, L; Cavagnoli, G; César, C.; Fronza, R; Gugel, F; Freitas, F; Ramos, J; Passos, E. - Indicações e achados diagnósticos em laparoscopias ginecológicas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev. ATM* 95/1, 1:11-16, 1995.

- Pate, JL; Landis Keyes, P. – Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction*, 122(5), 665-676, 2001.

- Pittaway, D; Maxson, W; Daniell, J; Herbert, C; Wentz, A. - Luteal phase defects in infertility patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 39: 712-713, 1983.30.

- Rönnerberg, L; Kauppila, A; Rajaniemi, H. - Luteinizing hormone receptor disorder in endometriosis. *Fertil Steril*, 42 (1): 64-68, 1984.

- Sims, JE. – IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opinion Immunol*, 14:117-122, 2002.

- Soules, M.; Malinak, L; Bury, R.; Poindexter, A. - Endometriosis and ovulation: A coexisting problem in the infertile female. *Am J Obstet Gynecol*, 125 (3): 412-417, 1976.

- Starzinski-Powitz, A; Gaetje, R; Zeitvogel, A; Kotzian, S; Handrow-Metzmacher, H; Herrmann, G; Fanning, E; Baumann, R. – Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Human Reprod. Update*, 4 (5): 724-729, 1998.

- Sugama, S; Kim, Y; Baker, H; Tinti, C; Kim, H; Joh, TH; Conti, B. – Tissue - specific expression of rat IL-18 gene and response to adenocorticotropic hormone treatment. *J Immunol*, 165(11), 6287-6292, 2000

- Terranova, PF; Rice, VM. – Review: cytokine involvement in ovarian processes *Am J Reprod Immunol*, 37(1), 50-63, 1997.

- The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 43:351-2, 1985.

- Tummon, I; Maclin, V; Radwanska, E; Binor, Z; Dmowski, W. - Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*, 50 (5): 716-720, 1988.

- Valle, R. -Endometriosis: current concepts and therapy. *Intern J Gynecol Obst*, 78: 107-119, 2002.

- Wu, MY; Ho, HN. – The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, 49 (5): 285-296, 2003.

- Yoshino, Y; Osuga, Y; Yano, T; Koga, K; Tsutsumi, O; Taketani, Y. – Evidence for the presence of IL-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein expression in the human endometrium. *Mol Huma Reprod*, 7(7): 649-654, 2001.

- Zhang, X; Lin, J; Qian, Y; Deng, L. – Decreased levels of interleukin-18 in peritoneal fluid but not in serum of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 81 (5), 1229-1234, 2004.

Interleukin-18 is not associated to infertility in women with minimal or mild endometriosis.

C.L. Glitz, J. Azevedo, M. Senger, F.M. Freitas, J.S. Cunha-Filho.

Ob/Gyn Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 90035-000.

E-mail: cglitz@ig.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND: There is some evidence showing immunologic alterations in women with endometriosis and infertility. Among the immunologic alterations we highlight the role of interleukin-18 (IL-18), mainly in infertile patients with mild/minimal endometriosis without anatomical abnormalities. We propose to evaluate the concentration of IL-18 in serum and peritoneal fluid in women with endometriosis. **METHODS:** We performed a cross-sectional study with 34 infertile patients with mild/minimal endometriosis and 22 controls (fertile patients). Serum and peritoneal dosages of IL-18 were collected.

RESULTS: The groups were not different in terms of age and BMI. There were no differences between dosages of IL-18 in peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis and control group: 290.85 ± 173.02 pg/ml x 374.21 ± 330.15 pg/ml and 391.07 ± 119.71 x 373.42 ± 129.11 , respectively ($P>0.05$). However, we found a positive association between serum and peritoneal IL-18 in patients with endometriosis ($r=0.794$, $P=0.0001$).

CONCLUSION: The concentrations of IL-18 were not different between the groups. We can refute the hypothesis that IL-18 is associated to infertility in women with minimal or mild endometriosis.

Key-words: cytokines/endometriosis/IL-18/peritoneal fluid.

INTRODUCTION

The association between endometriosis and infertility is already well known. A conservative prevalence suggests that about 20-25% of infertile women show endometriosis (Harada et al, 2001). Patients with moderate or severe endometriosis have secondary infertility to the anatomic cause. However, for those infertile women with minimal or mild endometriosis, the cause of infertility is not fully explained, involving hormonal, immunological, proliferative (endometrial) and uterine alterations. (Harada et al, 2001, Cunha-Filho et al, 2001, Mahutte et al, 2002).

Many studies have found high levels of cytokines in the peritoneal fluid (PF) of women with endometriosis, and these cytokines may be implied in the development and progression of endometriosis and infertility (Harada et al, 2001, Kyama et al, 2003).

In addition, some cytokines have been identified in the peritoneal fluid through highly sensitive essays. The cytokines found in women with endometriosis include: interleukines (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13), interferon- γ , tumoral necrosis factor, among others (Harada et al., 2001, Bedaiwy et al, 2002). The abnormal expression of several cytokines by the activation of macrophagous, such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF, in the peritoneal fluid of women with endometriosis can contribute to a peritoneal involvement, favoring the growth of endometrial cells and the establishment of endometriosis (Kyama et al, 2003).

Interleukin-18 (IL-18) is a cytokine that belongs to the interleukin 1 family, originally identified as interferon (IFN)- γ in Kupffer cells and macrophages (Okamura et al, 1998). IL-18 activates the Natural Killer (NK) cells and also shows a relevant role in the protection against bacterial infections. It plays a central role in the inflammatory cascade and the process of innate and acquired immunity as a result of its ability of inducing the production of IFN- γ in T lymphocytes and NK cells (Akinori et al, 2000). Moreover, IL-18 acts in synergy with IL-12 to promote the development of T helper response.

A few authors have already studied the association between IL-18 and endometriosis. Arici et al (2003) found levels of IL-18 in the peritoneal fluid of patients with treated endometriosis significantly higher than those of the control group; similar result was found by Oku et al in 2004 where immuno-histo-chemical analysis was also carried out. However, Zhang et al determined in 2004 the concentration of IL-18 in the peritoneal fluid and serum of women with endometriosis. By this author, the peritoneal concentration of IL-18 was significantly lower in patients with endometriosis than in the group without endometriosis.

The results in the literature, concerning the role of IL-18 in endometriosis, are discrepant; the studied groups are not homogeneous and most of the studies did not focused in infertile patients with minimal/mild endometriosis. We propose to evaluate the presence of IL-18 in serum and peritoneal fluid in infertile women with minimal and mild endometriosis.

MATERIAL E METHODS

Design

A cross-sectional study was carried out in a total of 56 patients, who were studied from March 2003 to December 2004 at Hospital de Clinicas de Porto Alegre for the investigation of infertility or tubal ligation.

Patients

Thirty four patients with minimal or mild endometriosis were submitted to laparoscopy during the investigation of infertility. The endometriosis was diagnosed during the laparoscopy and categorized in all patients according to the classification proposed by the *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1996). The same investigator carried out all endoscopic procedures. Other causes of infertility were excluded by hysteroscopy, sperm evaluation, FSH, PRL and TSH on cycle day 3.

The control group comprised twenty-two patients who underwent laparoscopy for tubal ligation. None of those patients were diagnosed with endometriosis, being all of them fertile and healthy patients.

The samples of peritoneal fluid (3mL – 6 mL) were collected during laparoscopic procedure under general anesthesia, immediately after the introduction of the second trocar, and the fluid was aspirated from the anterior or posterior peritoneal deflection. Samples were not collected when the presence of bleeding in the cavity was detected and we did not wash the peritoneal cavity. The blood samples were collected

during the same anesthetic procedure in all patients. Samples were centrifuged and stored at -80°C until the dosage time.

Clinical data from the menstrual cycle, obstetric history, previous surgery procedures and history of hormone use were also obtained by means of appropriate questionnaire. All patients who accepted to participate signed an informed consent form. The study was approved by the Ethical Committee of Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

IL-18 dosage

The serum and peritoneal IL-18 dosage was made through a specific kit - "Human IL-18 Immuno Assay ELISA kit" (MBL Co. Ltd, Nagoya, Japan), with the ability to particularly detect IL-18 in human secretions with high sensitivity. This assay sensitivity is 12.5 pg/ml. The minimal detection estimated would be $12.5 \text{ pg/ml} \pm 6.25 \text{ pg/ml}$.

Statistic analysis

Data with non-parametric distribution are described as median values and confidence interval of 95% and those with parametric distribution as mean and standard deviation. Student t test was used to compare means, Mann Whitney was used to compare median values and Spearman test for correlation analysis. When $P < 0.05$ the samples were considered statistically different.

Sample size was calculated from previously published studies, being power ($P\beta$) of 80% and $P\alpha$ of 5% used (Oku et al, 2004). The number previously calculated was 50 patients.

RESULTS

Clinical and demographic characteristics of the two groups did not differ. Mean age and standard deviation found for the group with endometriosis was 31.51 ± 4.54 years and for the control group 34.23 ± 3.56 year ($P=0.067$). The body mass index (BMI) did not show differences between the groups either, with mean of 24.21 ± 4.33 for the group with endometriosis and 24.69 ± 1.91 for the control group ($P=0.612$).

Out of 34 patients with endometriosis, 21 showed mild and 13 minimal endometriosis.

Table I shows the results of IL-18 in the peritoneal fluid and serum. There was no significant difference between the studied groups ($P>0.05$).

We evaluated the correlation between IL-18 in the serum and peritoneal and found a strong and positive association in the correlation between serum and peritoneal IL-18 levels ($r=0.794$, $P=0.0001$) (figure I).

Likewise, the stage of endometriosis was not associated with the dosages of IL-18 (serum or peritoneal) ($P > 0.05$), data not shown.

Moreover, peritoneal fluid IL-18 concentration collected during the luteal phase was compared to those samples collected during the follicular phase. This comparison was not different when control group patients was compared with cases ($P=0.730$) and also among endometriosis patients ($P=0.897$).

DISCUSSION

Our study did not find a significant difference between serum and peritoneal levels of IL-18 in infertile women with minimal and mild endometriosis. These findings would discard the role of IL-18 in infertile patients with mild/minimal endometriosis.

However, we did find a strong and positive correlation between the dosages of serum and peritoneal IL-18, probably indicating a systemic immunoregulatory role of IL-18 and not only a local (peritoneal) production of IL-18.

As seen before, several cytokines were associated with the pathogenesis of endometriosis (Harada et al, 2001, Bedaiwy et al, 2002). It is believed that alteration in the immunological system related to retrograde menstruation allowed the establishment of peritoneal implants that would result in endometriosis. Some studies suggest that endometriosis would be a kind of auto-immune disease (Dmowski et al, 2004, Arici et al, 2005). In addition, the circulating monocytes in women with endometriosis show a state of increased activation. Under basal and stimulating conditions these cells show higher levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 production in relation to cells of healthy patients (Dmowski et al, 2004).

IL-18, on its turn, has already been studied in relation to several other diseases, making the research of this interleukin important in patients with endometriosis. This cytokine has an immunoregulatory function and is predominantly produced by activated macrophages. Furthermore, it shares functional properties with IL-12 and structural similarities with the IL-1 family, its effects being, however, independent from both. IL-18 is capable also of inducing the production of interferon- γ by macrophages, T lymphocytes and "natural killer" cells (Blankenberg et al, 2002, Stuyt et al, 2003, Sheng-Ming et al, 2004, Zhang et al, 2004).

Regarding the effect of menstrual cycle on IL-18 secretion, our results are in agreement with others that exclude this association. Moreover, the strongly association between serum and peritoneal IL-18 concentration indicates that the role and secretion of this interleukin is systemic and not only local (peritoneal). This last finding reinforces our main conclusion about the role of IL-18 in infertile patients with mild/minimal endometriosis.

There are nowadays three studies that associate IL-18 dosage in the peritoneal fluid of patients with endometriosis, with discrepant results (Arici et al, 2003, Oku et al, 2004, Zhang et al, 2004).

The study accomplished by Zhang et al (2004) did not find a correlation between peritoneal levels of IL-18 and serum concentrations of IL-18. Other studies did not make this correlation, and this was the reason why we were interested in dosing both serum and peritoneal IL-18 and estimate its correlation.

Arici et al and Oku et al found high levels of IL-18 in the peritoneal fluids of women with endometriosis when compared to the group of control patients. Zhang's study found, though, reduced levels of IL-18 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis when compared to the group submitted to tubal ligation. We questioned whether the use of different kits for dosing IL-18 (Bender Medsystems, Sta Cruz Biotechnology and MBL, Co.) would be one of the reasons for the diverging results showed in these studies (table II), because the numeric values presented are very distinct, although the technique presented was the same (ELISA).

When we compare these three studies with our results, the composition of the study group in which the IL-18 dosage was made is different. We know that the selection of subjects can interfere in the final result, mainly when one works with new and variable methods and techniques.

The study of Arici et al associated the group of patients with endometriosis who had a previous history of treatment for endometriosis with GnRH agonist compared to patients who had no treatment. We do not know if the use of agonist could not interfere in the peritoneal fluid, altering the IL-18 dosage result. All previous studies included patients with endometriosis, including those with pelvic pain and/or infertility.

We only included infertile patients, and this also may be another reason for the discrepant results between the studies already published and our study. Perhaps it would be interesting to undertake an IL-18 peritoneal fluid study just in patients with endometriosis and pelvic pain, for example.

Our study has enough statistic power, as well care in the composition of the study groups (stages I and II of endometriosis) and the control group (fertile women without endometriosis) to test the hypothesis of association between IL-18 in the serum or peritoneal fluid in women with infertility and endometriosis.

Therefore, our objective and main focus was the investigation of mild/minimal endometriosis and its aspects in infertility. Our research does not discard the IL-18 role in women with endometriosis and pelvic pain.

In addition, it has been recently demonstrated that patients who are homozygote for IL-2 and with allele C have a greater susceptibility to the development of endometriosis. Conversely, the polymorphisms for genes of IL-18 and 12 were not related with endometriosis. Although not studying only infertile women, those authors have results that confirm our findings, removing IL-18 from the pathogeny of endometriosis (Hsieh et al, 2005).

In conclusion, women with minimal or mild endometriosis do not show any alteration in the concentration of IL-18 in the serum or peritoneal fluid. We can refute the hypothesis that this interleukin is associated to infertility in women with minimal or mild endometriosis.

Acknowledgements:

A special thanks to Dr Carmem Pilla and to Hospital de Clínicas de Porto Alegre Radioimmunoessay Laboratory.

We also thank HCPA-FIPE for its financial support.

Table I: Results of IL-18 dosages in the peritoneal and serum fluid (expressed as means and standard deviation).

	<i>Endometriosis</i>	<i>Control</i>	P
	<i>n=34</i>	<i>n=22</i>	
IL-18 in the peritoneal fluid (pg/ml)	290.85 ± 173.02	374.21 ± 330.15	0.987
IL-18 serum (pg/ml)	391.07 ± 119.71	373.42 ± 129.11	0.711

Table II: Comparison among IL-18 and endometriosis studies

Reference	Cases and controls	Kit used	Peritoneal fluid IL- 18-endometriosis (pg/ml)	Peritoneal fluid IL-18 - control group (pg/ml)
Zhang et al, 2004	22 / 22	Bender Medsystems,	144.8 ^a	653.4 ^a
Arici et al, 2003.	50 / 18	Santa Cruz Biotechnology	91.1 ± 6.5 ^b	59.4 ± 2.0 ^b
Oku et al, 2004	39 / 19	MBL, Co	592.57 ± 108.27 ^b	260.50 ± 55.88 ^b
Glitz et al, 2005	34 / 22	MBL, Co	290.85 ± 173.02 ^b	374.21 ± 330.15 ^b

a=median (range)

b=mean ± standard error

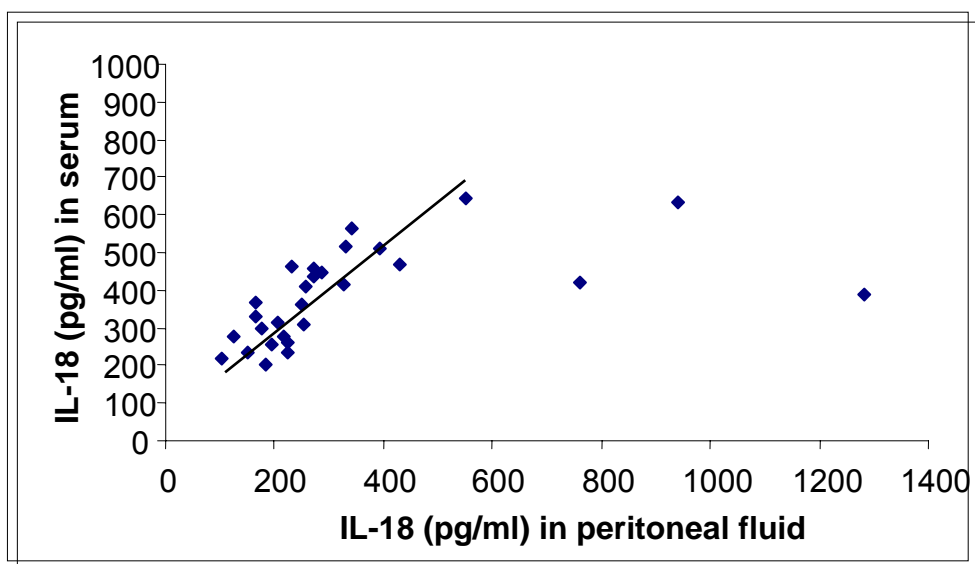


Figure I: Correlation of serum IL-18 levels and peritoneal IL-18 levels, $P < 0.001$, $r = 0.794$.

REFERENCES

- Akinori, I; Yosshiyuki T; Junko, M; Riichiro, K; Yuko, N; Susumu, A; Haruki, O; Koji, K. (2000) IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *Journal Reproductive Immunology*, 47: 65–74.
- Arici, A; Matalliotakis, I; Goumenou, A; Koumantakis, G; Vassiliadis, S; Mahutte, N. (2003) Altered expression of interleucin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 80 (4): 889-894.
- Arici, A; Ulukus, M. (2005) Immunology of endometriosis. *Minerva Gynecology*, 57 (3): 237-248.
- Bedaiwy, M; Falcone, T; Sharma, R; Goldberg, J; Attaran, M; Nelson, D; Agawal, A. (2002) Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Human Reproduction*, 17 (2): 426-431.
- Blankenberg, S; Laurence, T; Bickel, C; Peetz, D; Cambien, F; Meyer, J; Rupprecht, H. (2002) Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*, 106: 24-30.
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Brandelli, A; Castilhos, M; Passos, E. (2001) Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Hormonal Metabolism Research*, 33: 216-220.
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Dias, E; Vettori, D; Souza, C. (2002) Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin – releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal / mild endometriosis. *Human Reproduction*, 17 (4): 960-965.
- Cunha-Filho, JS; Lemos, NA; Freitas, FM; Kiefer, K; Faller, M; Passos, EP. (2003) Insulin like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein -1 and -3 in the

follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Human Reproduction*, 18 (2): 423-428.

- Dmowski, WP; Braun, D. (2004) Immunology of endometriosis. *Best practice & Research Clinical Obstetrics Gynecology*, 18 (2), 245-263.

- Emre, S; Arici, A. (2003) Endometriosis: Interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med*, 21: 135-144.

- Harada, T; Iwabe, T; Terakawa, N. (2001) Role of cytokines in endometriosis. *Fertility and Sterility*, 76 (1): 1-10.

- Hsieh, Y; Chang, C; Tsai, F; Hsu, C; Lin, C; Tsai, C. (2005) Interleucin-2 receptor β (IL-2R β) – 627* C homozygote but not IL-12R β 1 codon 378 or IL-18 105 polymorphism is associated with higher susceptibility to endometriosis. *Fertility and Sterility*, 84 (2): 510-512.

- Kyama, CM; Debrock, S; Mwenda, JM; D Hooghe, TM. (2003) Potencial involvement of the immune system in the development of endometrisis. *Reprod Biol Endocrinology*, 1:123.

- Liew, FY. (2003) The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunology Letters*, 85: 131-134.

- Mahutte, NG; Arici, A. (2002) New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *Journal Reproductive Immunology*, 55: 73-83.

- Marcoux, S; Maheux, R; Berube, S. (1997) Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild andometriosis. *New England Journal Medicine*, 337 (4): 217-222.

- Matorras, R; Rodíques, F; Pijoan, JI; Ramón, O; Terán, G; Rodríguez-Escudero, F. (1995) Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertility and Sterility*, 63 (1): 34-38.

- Oku, H; Tsuji, Y; Kashiwamura, S; Adachi, S; Kubota, H; Okamura, H; Koyama, K. (2004) Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Human Reproduction*, 19 (3), jan.

- Okamura, H; Tsutsui, H; Kashiwamura, S; Yashimoto, T; Nakanishi, K. (1998) Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunology*, 70: 281-312.

- Sheng-Ming, D; Matsuno, H; Nakamura, H; Nishoka, K; Yudoh, K. (2004) Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor α and interleukin-1 β production induced by direct contact with T lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 50 (2): 432-443.

- Stuyt, RJ; Netea, MG; Geijtenbeek, TB; Kullberg, BJ; Cinarello, CA; Van Der Meer, JW. (2003) Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology*, 110: 329-334.

- The American Fertility Society. (1985) Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 43:351-2.

- Zhang, X; Lin, J; Qian, Y; Deng, L. (2004) Decreased levels of interleukin-18 in peritoneal fluid but not in serum of patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 81 (5), 1229-1234.

Interleucina-18 não está associada à infertilidade em mulheres com endometriose mínima ou leve.

C.L. Glitz, J. Azevedo, M. Senger, F.M. Freitas, J.S. Cunha-Filho.

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 90035-000.

E-mail para correspondência: cglitz@iq.com.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: Endometriose é caracterizada pela presença e crescimento de tecido endometrial fora do útero, estando associada com infertilidade. Existem evidências mostrando uma série de alterações imunológicas em mulheres com endometriose e infertilidade. Dentre as alterações imunológicas, destacamos o papel da IL-18 e a imunomodulação hormonal. Propomos avaliar a concentração de IL-18 no fluido peritoneal e sérica em mulheres com endometriose, assim como sua modulação hormonal, pela dosagem peritoneal de prolactina (PRL), estradiol e progesterona.

MÉTODOS: Realizamos um estudo transversal com 34 pacientes inférteis com endometriose e 22 pacientes controle. Foram coletadas dosagens sérica de IL-18 e peritoneal de IL-18, estradiol, prolactina e progesterona. **RESULTADOS:** Idade e IMC não se mostraram diferentes entre os grupos ($P > 0,05$). Não houve diferença entre dosagens de IL-18 no fluido peritoneal e sérica, em mulheres inférteis com endometriose e férteis submetidas à ligadura tubária: $290,85 \pm 46,24$ pg/ml x $374,21 \pm 88,23$ pg/ml e $391,07 \pm 31,99$ x $373,42 \pm 34,5$, respectivamente. As dosagens de estradiol, prolactina e progesterona no fluido peritoneal não foram diferentes entre os grupos, assim como não houve uma associação destas dosagens e a dosagem de IL-18 no peritônio de mulheres inférteis com endometriose ($P > 0,05$). Encontramos uma associação positiva entre IL-18 sérica e peritoneal nas pacientes com endometriose ($r=0,794$, $P=0,0001$). **CONCLUSÃO:** Mulheres com endometriose e infertilidade não apresentam uma alteração no seu fluido peritoneal ou no soro de IL-18, não existe evidência de que haja alguma modulação hormonal intra-peritoneal de PRL, estradiol ou progesterona em relação a IL-18. Podemos refutar a hipótese que esta interleucina esteja associada a infertilidade em mulheres com endometriose mínima ou leve.

Palavras-chave: citocinas/endometriose/fluido peritoneal/IL-18.

Introdução

A associação de endometriose e infertilidade já é bem conhecida. Uma estimativa conservadora sugere que em torno de 20-25% das mulheres inférteis apresentam endometriose (Harada, 2001). Pacientes com endometriose moderada ou severa apresentam infertilidade secundária à causa anatômica. Entretanto, para aquelas mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve a causa da infertilidade não está totalmente esclarecida, envolvendo alterações hormonais, imunológicas, proliferativas (endometriais) e uterinas (Harada, 2001, Cunha-Filho, 2001, Mahutte, 2002).

Nosso grupo observou que pacientes com endometriose mínima e leve apresentam alterações na fase folicular precoce caracterizada pela diminuição dos níveis séricos de estradiol bem como pelo aumento na prevalência de hiperprolactinemia e insuficiência lútea. Pacientes com endometriose mínima e leve também teriam uma alteração na secreção de prolactina após estímulo com hormônio tireotrófico (TRH), (Cunha-Filho, 2000, 2001).

Estudos têm encontrado níveis elevados de inúmeras citocinas no fluido peritoneal (FP) de mulheres com endometriose, implicando então essas citocinas no desenvolvimento e progressão da endometriose e da infertilidade (Harada, 2001, Kyama, 2003).

Algumas citocinas têm sido identificadas no fluido peritoneal por ensaios altamente sensíveis. As citocinas encontradas em mulheres com endometriose incluem: IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, interferon- γ , fator de necrose

tumoral entre outros (Harada, 2001, Bedaiwy, 2002). A expressão anormal de inúmeras citocinas pela ativação de macrófagos, como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF, no fluido peritoneal de mulheres com endometriose quando comparadas ao grupo controle, pode contribuir para um envolvimento peritoneal, favorecendo a implantação de células endometriais e o estabelecimento da endometriose (Kyama, 2003).

A IL-18 é uma citocina que pertence a família da interleucina 1, originariamente identificada como interferon (IFN)- γ nas células de Kupffer e macrófagos (Okamura, 1998). Atualmente reconhecida como importante regulador da resposta imune inata e adquirida. Desde então, as funções imunológicas da IL-18 têm sido estudadas. A IL-18 ativa células Natural Killer (NK) e apresenta também papel importante na proteção contra infecções bacterianas. Tem papel central na cascata da inflamação e no processo de imunidade inata e adquirida em função de sua habilidade de induzir a produção de IFN- γ em linfócitos T e células NK (Akinori, 2000). A IL-18 atua em sinergia com IL-12 para promover o desenvolvimento da resposta T helper.

Alguns autores já estudaram a associação de IL-18 e endometriose. Arici et al (2003) encontraram níveis de IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose tratada significativamente maior do que no grupo controle; resultado semelhante foi encontrado por Oku et al em 2004 que também realizou análise imuno-histoquímica. Entretanto, Zhang em 2004 determinou a concentração de IL-18 no fluido peritoneal e no soro de mulheres com endometriose e comparou ao grupo controle. A concentração peritoneal de IL-18 estava significativamente mais baixa em pacientes com endometriose do que no grupo sem endometriose.

Como os resultados na literatura são discordantes, os grupos estudados não são homogêneos e não existem estudos avaliando o efeito dos hormônios na concentração de IL-18, propomos avaliar a presença de IL-18 no fluido peritoneal e sérica em mulheres inférteis com endometriose mínima e leve, bem como dosagens hormonais de estradiol, prolactina e progesterona no fluido peritoneal.

Material e Métodos

Delineamento

Foi realizado em estudo transversal com um total de 56 pacientes estudadas no período de março de 2003 a dezembro de 2004, no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para investigação de infertilidade ou para submeterem-se a ligadura tubária.

Pacientes

Trinta e quatro pacientes com endometriose mínima ou leve foram submetidas à laparoscopia durante a investigação de infertilidade. A endometriose foi diagnosticada durante a laparoscopia e categorizada em todas as pacientes segundo a classificação proposta pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1985). Os procedimentos endoscópicos foram realizados pelo mesmo investigador (CLG).

O grupo controle incluiu vinte e duas pacientes que realizaram laparoscopia para ligadura tubária. Em nenhuma dessas pacientes foi diagnosticado endometriose e todas eram pacientes férteis e saudáveis.

As amostras de fluido peritoneal (3mL – 6 mL) foram coletadas durante o procedimento de laparoscopia sob anestesia geral. Realizou-se a coleta imediatamente após a introdução do segundo trocar e o fluido foi aspirado do fundo de saco posterior. Não foram coletadas amostras quando identificada presença de sangramento na cavidade e não realizamos lavagem da cavidade peritoneal. As amostras de sangue foram coletadas durante o mesmo procedimento anestésico de todas as pacientes. As amostras foram centrifugadas e armazenadas a -80°C até o momento das dosagens.

Dados clínicos, do ciclo menstrual e da história obstétrica também foram obtidos por meio de questionário apropriado. Todas as pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido pós-informação. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Dosagem de IL-18

A dosagem de IL-18 sérica e peritoneal foi realizada através de kit específico – “Human IL-18 Immuno Assay ELISA kit” (MBL Co. Ltd, Nagoya, Japan), com capacidade de detectar especificamente IL-18 em secreções humanas com alta sensibilidade. A sensibilidade desse ensaio é de 12,5 pg/ml. A detecção mínima estimada seria de $12,5 \text{ pg/ml} \pm 6,25 \text{ pg/ml}$.

Dosagens hormonais

Foram realizadas dosagens hormonais de estradiol, prolactina e progesterona no fluido peritoneal de todas as pacientes. Os hormônios foram analisados usando kits de quimioluminescência (Immulite Ltd., USA). A maior variação entre os kits foi de 5,45 e 13,3% para a prolactina, 15 a 16% para o estradiol e 13 % para a progesterona. Não houve reação cruzada significativa entre os hormônios medidos.

Análise estatística

Os dados com distribuição não paramétrica são descritos com valores de mediana e intervalo de confiança de 95% e os paramétricos com valores da média e desvio padrão. Teste t foi utilizado para comparações de médias, Mann Whitney para as medianas e teste de Spearman para análise de correlação. Quando $P < 0,05$ as amostras foram consideradas diferentes estatisticamente.

O número da amostra foi calculado a partir de estudos publicados anteriormente, sendo utilizado poder ($P\beta$) de 80% e $P\alpha$ de 5% (Oku, 2004). O número calculado previamente foi de 50 pacientes.

RESULTADOS

As características clínicas e demográficas dos dois grupos não se mostraram diferentes. A média de idade e desvio padrão encontrada para o grupo com endometriose foi de $31,51 \pm 4,54$ anos e para o grupo controle foi de $34,23 \pm 3,56$ anos ($P=0,067$). O índice de massa corporal (IMC) também não apresentou diferenças entre os grupos, com média de $24,21 \pm 4,33$ para o grupo com endometriose e $24,69 \pm 1,91$ para o grupo controle ($P=0,612$).

De um total de 34 pacientes com endometriose, 21 apresentavam endometriose grau 2 (leve) e 13 com endometriose grau 1 (mínima).

A tabela 1 mostra os resultados da IL-18 no fluido peritoneal e soro, assim como as dosagens hormonais de prolactina, estradiol e progesterona no fluido peritoneal. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($P>0,05$).

Avaliamos a correlação entre IL-18 no soro e peritoneal e encontramos uma forte e positiva associação na correlação entre os níveis de IL-18 peritoneal e sérica ($r=0,794$, $P=0,0001$) (figura 1).

Não ficou demonstrada nenhuma correlação entre IL-18 peritoneal e as dosagens hormonais no fluido peritoneal de prolactina ($r=-0,123$; $P=0,368$), estradiol ($r=0,035$; $P=0,804$) ou progesterona ($r=0,108$; $P=0,446$).

Da mesma forma, não houve diferença significativa nas dosagens de IL-18 peritoneais e séricas ou hormonais, ao compararmos pacientes com endometriose mínima e endometriose leve ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Nosso estudo não encontrou diferença significativa entre os níveis séricos e peritoneais de IL-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima e leve. Da mesma forma, não encontramos diferenças significativas entre as dosagens hormonais (estradiol, prolactina e progesterona) realizadas no fluido peritoneal de ambos os grupos bem como na correlação com a IL-18 peritoneal. Isso descartaria a hipótese de modulação hormonal da IL-18 no grupo de pacientes inférteis com endometriose mínima ou leve.

No entanto, encontramos uma forte e positiva correlação entre as dosagens de IL-18 sérica e peritoneal, indicando provavelmente uma produção sistêmica imunorreguladora e não somente produção local (peritoneal) de IL-18 associada a pacientes inférteis com endometriose.

Como visto anteriormente, várias citocinas foram associadas com a patogênese da endometriose (Harada, 2001, Bedaiwy, 2002). Acredita-se que alterações no sistema imunológico relacionadas à menstruação retrógrada permitiriam o estabelecimento dos implantes peritoneais que resultariam na endometriose. Alguns estudos sugerem que a endometriose seria um tipo de doença auto-imune (Dmowski, 2004, Arici, 2005). Em mulheres com endometriose os monócitos circulantes demonstram um estado de ativação aumentado (visto através de

quimioluminescência). Sob condições basais e de estimulação, estas células apresentam maiores níveis de produção de TNF- α , IL-6 e IL-8 em relação a células de pacientes saudáveis (Dmowski, 2004).

A IL-18, por sua vez, já foi estudada em relação a várias outras doenças, e assim a busca de sua relação com a endometriose tornou-se importante. Esta citocina tem função imunorreguladora e é produzida predominantemente por macrófagos ativadas. Além disso, compartilha propriedades funcionais com a IL-12 e similaridades estruturais com a família da IL-1, porém seus efeitos são independentes de ambas. A IL-18 é capaz de induzir a produção de interferon- γ por macrófagos, linfócitos T e células “natural killer” (Blankenberg, 2002, Stuyt, 2003, Sheng-Ming, 2004, Zhang, 2004).

Existem atualmente três estudos associando a dosagem de IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose, com resultados discordantes (Arici, 2003, Oku, 2004, Zhang, 2004).

O trabalho realizado por Zhang et al (2004) não encontrou correlação entre os níveis peritoneais de IL-18 e as concentrações séricas de IL-18. Os demais trabalhos não realizaram essa correlação. Por isso tivemos o interesse em dosar tanto a IL-18 sérica como peritoneal e avaliar sua correlação.

Arici et al e Oku et al encontraram níveis elevados de IL-18 no fluido peritoneal de mulheres com endometriose quando comparadas ao grupo de pacientes controle. Já o estudo de Zhang et al encontrou níveis reduzidos de IL-18 no fluido peritoneal de pacientes com endometriose quando comparadas àquele grupo submetido à ligadura

tubária. Questionamos se o uso de diferentes kits para dosagem de IL-18 (Bender Medsystems, Sta Cruz Biotechnology e MBL, Co.) seria um dos motivos para os resultados divergentes apresentados nesses estudos (tabela 2). Em nosso trabalho utilizamos o kit de IL-18 humana ELISA fornecido pela MBL Co. Ltd, Nagóia, Japão. Pois os valores numéricos apresentados são bastante distintos, embora a técnica empregada seja a mesma (ELISA).

Um outro fator importante a ser levado em consideração quando comparamos esses três trabalhos com os nossos resultados é a composição de grupo de pacientes em que foi realizada a dosagem de IL-18. Sabemos que a escolha das pacientes pode interferir bastante no resultado final, principalmente quando trabalhamos com métodos e técnicas novas e com grande variabilidade.

O trabalho de Arici et al associou no grupo endometriose pacientes com história de tratamento prévio para endometriose com agonista GnRH às pacientes sem tratamento. Não sabemos se o uso de agonista não poderia interferir no fluido peritoneal, alterando o resultado da dosagem de IL-18. Todos os trabalhos incluíram pacientes com diagnóstico de endometriose independentemente do motivo para realização da laparoscopia, isso inclui pacientes com infertilidade e pacientes com queixa de dor pélvica.

Em nosso trabalho utilizamos somente aquelas pacientes com história de infertilidade, podendo esse ser um outro motivo para os resultados discordantes entre os estudos já publicados e nosso trabalho. Talvez futuramente seja interessante realizar um estudo de IL-18 no fluido peritoneal somente em pacientes com endometriose e dor pélvica para podermos fazer essa comparação.

Nosso estudo apresentou poder estatístico suficiente, assim como cuidado na composição dos grupos em estudo (somente mulheres com estágio I e II de endometriose) e controle (mulheres comprovadamente férteis sem endometriose) para testar a hipótese da associação da IL-18 no soro ou fluido peritoneal, assim como a modulação hormonal da IL-18 em mulheres com infertilidade e endometriose.

Portanto, nosso objetivo e foco principal do estudo foi a investigação da endometriose em mulheres inférteis. Isso não descarta que em mulheres com endometriose e dor pélvica anormalidades na IL-18 não possam estar associadas ao líquido peritoneal, diferente dos autores anteriores (Arici, 2003, Oku, 2004, Zhang, 2004).

Alguns estudos atuais falam em modulação hormonal e citocinas em pacientes com endometriose. Arici et al em 2005 mostraram pela primeira vez que os esteróides sexuais são capazes de regular a secreção da IL-8 e sua transcrição em células endoteliais endometriais *in vitro*, sugerindo um novo papel dessas células na fisiopatologia da endometriose (Arici, 2005). Não encontramos em nosso estudo diferenças entre as dosagens hormonais no fluido peritoneal de pacientes com endometriose bem como não encontramos correlação da PRL, estradiol e progesterona com IL-18 peritoneal.

Recentemente, foi demonstrado que pacientes homocigotos para IL-2 e com o alelo C tem maior suscetibilidade ao desenvolvimento de endometriose, ao contrário da pesquisa de polimorfismos para os genes das IL-18 e IL-12. Estes autores, embora

não estudassem apenas mulheres inférteis tem resultados que corroboram com nossos achados, refutando a IL-18 da patogênese da endometriose (Hsieh, 2005).

Como existe uma série de anormalidades hormonais descritas em mulheres com endometriose (Cunha-Filho, 2000, 2001, 2002) fica evidente que futuramente, possamos esclarecer melhor o papel da imunomodulação na endometriose.

Em conclusão, mulheres com endometriose mínima ou leve e infertilidade não apresentam uma alteração no fluido peritoneal ou no soro de IL-18. Não demonstramos também alguma evidência de que exista modulação hormonal intra-peritoneal de PRL, estradiol ou progesterona em relação a IL-18. Podemos refutar a hipótese que esta interleucina esteja associada à infertilidade em mulheres com endometriose mínima ou leve.

Agradecimentos:

Agradecimento especial a Dra. Carmem Pilla e laboratório de Radioimunoensaio do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À FIPE pelo auxílio financeiro.

Tabela 1: Resultados das dosagens de IL-18 no fluido peritoneal e sérica e das dosagens hormonais no fluido peritoneal, médias e desvio padrão.

	Endometriose	Controle	<i>P</i>
	n=34	n=22	
IL-18 no fluido	290,85 ± 173,02	374,21 ± 330,15	0,987

peritoneal (pg/ml)			
IL-18 sérica (pg/ml)	391,07 ± 119,71	373,42 ± 129,11	0,711
Estradiol*	217,94 ± 105,18	333,09 ± 167,86	0,256
Prolactina*	17,23 ± 2,13	25,22 ± 5,19	0,158
Progesterona*	24,57 ± 20,61	50,60 ± 29,61	0,111

* Resultados referentes à dosagem no fluido peritoneal

Tabela 2: comparação entre os estudos com IL-18 e endometriose

Referência	Casos e controles	Kit utilizado	IL-18 peritoneal endometriose (pg/ml)	IL-18 peritoneal - grupo controle (pg/ml)
Zhang et al, 2004	22 / 22	Bender Medsystems,	144,8 ^a	653,4 ^a
Arici et al, 2003.	50 / 18	Santa Cruz Biotechnology	91,1 ± 6,5 ^b	59,4 ± 2,0 ^b
Oku et al, 2004	39 / 19	MBL, Co	592,57 ± 108,27 ^b	260,50 ± 55,88 ^b
Glitz et al, 2005	34 / 22	MBL, Co	290,85 ± 173,02 ^c	374,21 ± 330,15 ^c

a=mediana (range)

b=média ± erro padrão

c=média ± desvio padrão

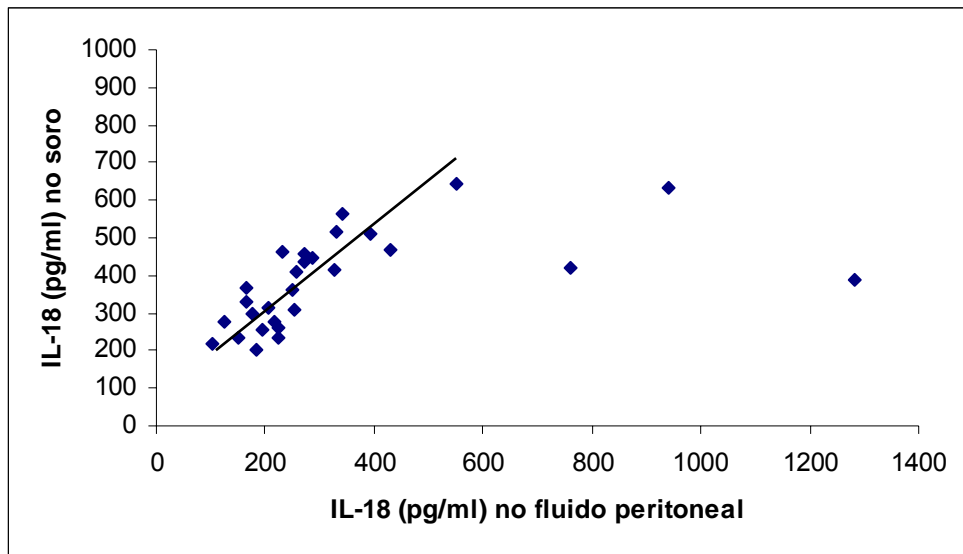


Figura 1 : Correlação de IL-18 sérica e peritoneal, $P < 0,001$, $r = 0,794$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akinori, I; Yosshiyuki T; Junko, M; Riichiro, K; Yuko, N; Susumu, A; Haruki, O; Koji, K. – IL-18 in pregnancy; the elevation of IL-18 in maternal peripheral blood during labour and complicated pregnancies. *Journal Reprod. Immunol*, 47: 65–74, 2000.
- Arici, A; Matalliotakis, I; Goumenou, A; Koumantakis, G; Vassiliadis, S; Mahutte, N. – Altered expression of interleucin-18 in the peritoneal fluid of women with enodmetriosis. *Fertil Steril*, 80 (4): 889-894, 2003.
- Arici, A; Ulukus, M. – Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecol*, 57 (3): 237-248, 2005.
- Bedaiwy, M; Falcone, T; Sharma, R; Goldberg, J; Attaran, M; Nelson, D; Agawal, A. - Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Human Reprod*, 17 (2): 426-431, 2002.
- Blankenberg, S; Laurence, T; Bickel, C; Peetz, D; Cambien, F; Meyer, J; Rupprecht, H. - Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*, 106: 24-30, 2002.
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Brandelli, A; Castilhos, M; Passos, E. – Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal enodmetriosis. *Horm Metat Res*, 33: 216-220, 2001.
- Cunha-Filho, JS; Gross, J; Lemos, N; Dias, E; Vettori, D; Souza, C. – Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin – releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal / mild endometriosis. *Human Reprod*, 17 (4): 960-965, 2002.

- Cunha-Filho, JS; Lemos, NA; Freitas, FM; Kiefer, K; Faller, M; Passos, EP. – Insulin like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein -1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. *Human Reprod*, 18 (2): 423-428, 2003.
- Dmowski, WP; Braun, D. – Immunology of endometriosis. *Best practice & Research Clin Obstet Gynecol*, 18 (2), 245-263, 2004.
- Emre, S; Arici, A. – Endometriosis: Interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med*, 21: 135-144, 2003.
- Harada, T; Iwabe, T; Terakawa, N. - Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril*, 76 (1): 1-10, 2001.
- Hsieh, Y; Chang, C; Tsai, F; Hsu, C; Lin, C; Tsai, C. – Interleucine-2 receptor β (IL-2R β) – 627* C homozygote but not IL-12R β 1 codon 378 or IL-18 105 polymorphism is associated with higher susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*, 84 (2): 510-512, 2005.
- Kyama, CM; Debrock, S; Mwenda, JM; D Hooghe, TM. – Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:123, 2003.
- Liew, FY. – The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol Letters*, 85: 131-134, 2003.
- Mahutte, NG; Arici, A. – New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *Journal Reprod Immunol*, 55: 73-83, 2002.
- Marcoux, S; Maheux, R; Berube, S. – Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. *New England J Méd*, 337 (4): 217-222, 1997.
- Matorras, R; Rodíques, F; Pijoan, JI; Ramón, O; Terán, G; Rodríguez-Escudero, F. – Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*, 63 (1): 34-38, 1995.

- Oku, H; Tsuji, Y; Kashiwamura, S; Adachi, S; Kubota, H; Okamura, H; Koyama, K. – Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Human Reprod*, 19 (3), jan. 2004.

- Okamura, H; Tsutsui, H; Kashiwamura, S; Yashimoto, T; Nakanishi, K. – Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol*, 70: 281-312, 1998.

- Sheng-Ming, D; Matsuno, H; Nakamura, H; Nishoka, K; Yudoh, K. – Interleukin-18 enhances monocyte tumor necrosis factor α and interleukin-1 β production induced by direct contact with T lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism*, 50 (2): 432-443, 2004.

- Stuyt, RJ; Netea, MG; Geijtenbeek, TB; Kullberg, BJ; Cinarello, CA; Van Der Meer, JW. – Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunol*, 110: 329-334, 2003.

- The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*, 43:351-2, 1985.

- Zhang, X; Lin, J; Qian, Y; Deng, L. – Decreased levels of interleukin-18 in peritoneal fluid but not in serum of patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 81 (5), 1229-1234, 2004.

7. CONCLUSÕES

A dosagem de IL-18 no fluido peritoneal e sérica não se mostrou diferente quando comparado o grupo controle (mulheres férteis sem endometriose) ao grupo de mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.

As dosagens hormonais de prolactina, progesterona e estradiol no fluido peritoneal não foram diferentes quando comparamos o grupo de mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve ao grupo controle.

Existe uma forte e positiva associação entre IL-18 sérica e peritoneal, demonstrada pelos testes de correlação em mulheres inférteis com endometriose mínima e leve.

Não existe correlação das dosagens peritoneais de prolactina, estradiol e progesterona, quando correlacionadas aos valores de IL-18 peritoneal em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve.

Em conclusão, mulheres com endometriose mínima ou leve e infertilidade não apresentam uma alteração no fluido peritoneal ou no soro de IL-18. Não

demonstramos também alguma evidência de que exista modulação hormonal intra-peritoneal de PRL, estradiol ou progesterona em relação a IL-18. Podemos refutar a hipótese que esta interleucina esteja associada à infertilidade em mulheres com endometriose mínima ou leve.

8. PERSPECTIVAS

Novos estudos podem ser realizados para avaliar o papel da IL-18 em mulheres com endometriose e dor pélvica isoladamente, pois os trabalhos atuais enfocam mulheres inférteis.

Novas citocinas ainda poderão ser estudadas em mulheres com endometriose na tentativa de encontrarmos ou desvendarmos a fisiopatologia dessa doença.

Os estudos com marcadores séricos para endometriose ainda poderão ser realizados, com o objetivo de encontrarmos uma maneira de diagnosticar endometriose sem necessidade de expor a paciente a um procedimento cirúrgico.

9. ANEXOS

Classificação de endometriose mediante visualização dos implantes pela laparoscopia (ASRM 1985).

Estádio I: (mínima)	1-5			
Estádio II: (leve)	6-15			
Estádio III: (moderada)	16-40			
Estádio IV: (grave)	> 40			
Score_____	Estadiamento_____			
	Endometriose	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
Peritônio	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
	D Superficial	1	2	4
Ovário	Profunda	4	16	20
	E Superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
Obliteração do Fundo-de-Saco Posterior	Parcial 4		Completa 40	
	Aderência	< 1/3 Envolvido	1/3 – 2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
Ovário	D Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
	E Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16

PROTOCOLO DE PESQUISA

Nome: _____
—

Prontuário: _____

Idade: _____

Paridade: _____

Peso: _____

Altura: _____

IMC (Kg/m²): _____

DUM: _____

Submetida a videolaparoscopia em _____ () CCA ()
BC

Motivo da videolaparoscopia: LT () Dor pélvica () Infertilidade ()

Endometriose: I ()
II ()
III ()
IV ()

MAC: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO.

Gostaríamos de convidá-la para participar do estudo “**Concentração sérica e peritoneal da IL-18 em mulheres com endometriose**”, tendo como objetivo principal a realização de um trabalho científico para a avaliação da interleucina-18 (um marcador de inflamação) no líquido peritoneal e sanguínea.

A realização de laparoscopia faz parte de sua investigação de dor ou infertilidade e a chance de ocorrer alguma complicação é de 3 para 1033 exames realizados. A senhora receberá uma avaliação pré-operatória cuidadosa antes de submeter-se à laparoscopia sob anestesia geral.

O procedimento de acompanhamento da endometriose será absolutamente igual a rotina já estabelecida, tanto para controle de dor como para infertilidade e a Senhora não corre nenhum risco adicional.

Estes exames e testes fazem parte de sua investigação usual. Todavia estaremos realizando coletas de sangue durante o procedimento anestésico e a coleta de líquido peritoneal será realizada durante o procedimento cirúrgico, sem que a senhora tenha nenhum tipo de desconforto.

Eu, _____, fui informada dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, frente a estas informações.

O profissional _____, certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informada que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

ASSINATURA

DA

PACIENTE: _____

ASSINATURA
INVESTIGADOR: _____

DO

ASSINATURA
ORIENTADOR: _____

DO

DATA: _____

Pesquisadores responsáveis: Cristina Luce Glitz e João Sabino Cunha-Filho
Telefone para contato e dúvidas: 3316-8117 / 9835-4647

Printed: February 10, 1999

Revised: July 19, 1999

For research use only. Not for use in diagnostic procedure.

Quantitative test kit for Human IL-18

Human IL-18 ELISA Kit

CODE .No. 7620

CONTENTS

1. Intended Use -----	1
2. Summary and Explanation-----	1
3. Principle -----	2
4. Materials provided -----	2
5. Materials and equipment required -----	2
6. Procedure -----	3
7. Precaution -----	5
8. Storage and Stability -----	6
9. Performance Characteristics -----	7
10. References -----	9

Before use, thoroughly read these Instructions.

Intended Use

The Human IL-18 ELISA Kit is based on sandwich ELISA and capable of measuring human IL-18.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Summary and Explanation

Interleukin 18 (IL-18) is a 18 kDa novel cytokine which is identified as a costimulatory factor for production of interferon- γ (IFN- γ) in response to toxic shock. It shares functional similarities

with IL-12. IL-18 is synthesized as a precursor 24 kDa molecule without a signal peptide and must be cleaved to produce an active molecule. IL-1 β converting enzyme (ICE, Caspase-1) cleaves pro-IL-18 at aspartic acid in the P1 position, producing the mature, bioactive peptide that is readily released from the cells. It has been reported that IL-18 is produced from Kupffer cells, activated macrophages, keratinocytes, intestinal epithelial cells, osteoblasts, adrenal cortex cells and murine diencephalon.

IFN- γ is produced by activated T and NK cells and plays critical roles in the defense against microbial pathogens. IFN- γ activates macrophages, enhances NK activity and B cell maturation, proliferation and Ig secretion, induces MHC class I and II antigens expression, and inhibits osteoclast activation. IL-18 acts on T helper 1-type T (Th1) cells and in combination with IL-12 strongly induces production of IFN- γ by these cells. Pleiotropic effects of IL-18 have also been reported, including enhancement production of IFN- γ and GM-CSF in peripheral blood mononuclear cells, production of T helper type 1 cytokines, IL-2, GM-CSF and IFN- γ in T cells, enhancement of Fas ligand expression by T helper type 1 cells. "Human IL-18 ELISA Kit " is the reagent for measuring human IL-18 specifically with high sensitivity by ELISA. 1 ng/mL of various cytokines, such as human IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF and murine IL-18 were measured by this ELISA. The results were all below the detection limit of 12.5 pg/mL.

-1-

Principle

The Human IL-18 ELISA Kit measures human IL-18 by sandwich ELISA. The assay uses two monoclonal antibodies against two different epitopes of human IL-18. In the wells coated with anti-human IL-18 monoclonal antibody, samples to be measured or standards are incubated. After washing, a peroxidase conjugated anti-human IL-18 monoclonal antibody is added into the microwell and incubated. After another washing, the peroxidase substrate is mixed with the chromogen and allowed to incubate for an additional period of time. An acid solution is then added to each well to terminate the enzyme reaction and to stabilize the developed color. The optical density (O.D.) of each well is then measured at 450 nm using a microplate reader. The concentration of human IL-18 is calibrated from a dose response curve based on reference standards.

Materials provided

Each kit contains;

Materials Quantity (96wells)

Microwell strips coated with anti-Human IL-18 antibody 8-well strip x 12strips

Human IL-18 calibrator (Lyophilized) 2 vials

Conjugate reagent (Peroxidase conjugate anti-Human IL-18 monoclonal antibody) (x 101)

0.2 mL x 1vial

Conjugate diluent (ready to use) 24 mL x 1vial

Assay diluent (ready to use) 30 mL x 1vial

Wash concentrate (x10) 100 mL x 1vial

Substrate reagent (TMB/H₂O₂) (ready to use) 15 mL x 1vial

Stop solution (2N H₂SO₄) (ready to use) (irritant) 18 mL x 1vial

Materials and equipment required

- * Microplate reader
- * Plate washer or washing bottle
- * Adjustable micropipette
- * Multichannel micropipette
- * 96-well polyvinyl plate
- * Microplate holder
- * Uncoated microwell strips (for using Auto washer)
- * Reagent vessel
- * Distilled water

-2-

Procedure

Preparation of Reagents

1. Wash solution

Dilute 100 mL of wash concentrate with 900 mL of distilled water. The diluted wash solution is stable for 2 weeks at 4°C.

2. Conjugate solution

Peroxidase conjugated anti-human IL-18 monoclonal antibody must be diluted prior to use.

Dilute the Peroxidase conjugated anti-human IL-18 monoclonal antibody 1:101 with Conjugate diluent.e.g. by adding 10 µL of the Peroxidase conjugated anti-human IL-18 monoclonal antibody to 1,000 µL of the Conjugate diluent.

* Prepare only a sufficient amount of the conjugate solution for the assay because the diluted

conjugate is not stable.

* Use disposable new pipette and vessel to avoid contamination of microbe.

3. Standards

Reconstitute with the volume of Assay diluent, and dilute the reconstituted calibrator as indicated "Preparation of Standards" .

* If reconstituted calibrator is needed to store, prepare appropriate aliquots and freeze them below -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

4. Other reagents (microwell strips coated with anti-human IL-18 antibody, Conjugate diluent, Assay diluent, Substrate reagent and Stop solution) are ready-to-use.

Preparation of samples

1. Sample type

Serum and EDTA plasma can be used.

Appropriate specimen collection and preparation should be established by each investigator

for other biomedical fluid.

2. Dilution

Dilute each sample with Assay diluent.

e.g. Human Serum or EDTA Plasma

1:5 with Assay diluent e.g. by adding 50 µL of sample to 200 µL Assay diluent. Sample dilution may vary between different specimens. Appropriate sample dilution should be established by each investigator.

3. Storage

Fresh samples should be used. Aliquote each sample into new plastic tube and store below

-20°C if necessary. Avoid repeated freezing and thawing.

STEP 1. (Sample incubation)

Duplicate assay will be recommended.

-3-

1) Add 150 μL of prepared samples and standards to 96-well polyvinyl plate as the same order of assay run. Then, transfer 100 μL of each sample to the antibody coated microwell simultaneously using multichannel pipette.

* Reaction starts on pipetting to the antibody coated microwell. Pipetting should be completed as quickly as possible.

2) Incubate for 60 minutes at room temperature (20 - 25°C) .

STEP 2. (Washing)

Aspirate or discard the well contents. Fill the well with Wash solution and then completely

aspirate or discard the contents. Wash the well 4 times with wash solution using washing

bottle. When autowasher is used, wash 4 times.

* Each laboratory is recommended to confirm its own appropriate washing times and set-up.

* Washing buffer should be used at room temperature (20 - 25°C) .

STEP 3. (Conjugate incubation)

1) Pour conjugate solution into the vessel. After removing wash solution remained completely, pipette 100 μL of Conjugate solution to each well with multichannel pipette.

2) Incubate for 60 minutes at room temperature (20 - 25°C) .

STEP 4. (Washing)

Wash the microplate again following the STEP 2 procedure.

STEP 5 (Substrate incubation)

1) Pour substrate reagent into the vessel. Add 100 μL of prepared substrate reagent to each well.

* Substrate reagent should be used at room temperature (20 - 25°C) .

* This vessel should be different from the one which was used for pouring conjugate solution.

* Use disposable new pipette and vessel, as substrate reagent is easy to be oxidized by metal

ions and be contaminated by microbe.

* If substrate reagent is poured into the vessel from the bottle, do not return to the bottle.

2) Incubate for 30 minutes at room temperature (20 - 25°C).

STEP 6. (Stopping reaction)

Pour Stop solution into the vessel. Pipette 100 μL of stop solution to each well with multichannel pipette.

Reading

Read the absorbance of each well at 450 nm. If a dual wavelength plate reader is available,

-4-

set the test wave length at 450 nm and the reference at 620 nm.

* Reading should be done within 30 minutes after Stopping reaction.

Calculation of results

Calculate the mean absorbance value of each standard. Plot on the semi-log graph paper and

construct a standard curve [Absorbance on the vertical axis, concentration (in pg/mL) on the

horizontal axis].

Report the IL-18 concentration of samples by multiplying the value read from the standard

curve by dilution factor (e.g. Human sera; x 5).

* If absorbance of sample exceeds the one of the 1,000 pg/mL standard, dilute the sample

and measure again.

0.0

0.5

1.0

1.5

2.0

10 100 1000

IL-18 concentration (pg/mL)

absorbance at 450 nm

~ **Example of Standard curve**

~ **Concentration of Human IL-18 in normal sera**

Serum samples from 46 healthy blood donors were assayed by the Human IL-18 ELISA

Kit . The results were as follows.

maximum = 257.8 pg/mL

minimum = 36.1 pg/mL

mean = 126.0 pg/mL

SD = 44.5 pg/mL

mean+3SD = 259.4 pg/mL

-5-

Precaution

1. Allow all the components to come to room temperature (20 - 25°C) before use.
2. All microwell strips which are not immediately required should be returned to the ziplock

pouch, which must be carefully resealed to avoid moisture absorption.

3. Fresh samples should be used. Aliquote each sample and store below -20°C if necessary.

Avoid repeated freezing and thawing. Never store the samples at 4°C, as samples are affected

by storage of this temperature.

4. When Wash concentrate is stored at 2 - 8°C some precipitation or turbidity may appear.

However it does not affect the reagent efficiency. Dissolve the wash concentrate completely

when prepare the wash solution.

5. Assay diluent and Human IL-18 calibrator contain sodium azide (0.1%) as preservative.

Azide may react with copper or lead in plumbing system to form explosive metal azide.

Therefore, always flush with plenty of water into a drain when disposing materials containing azide.

6. Stop solution is 2N sulfuric acid. As it is corrosive product, protect eyes and skin and handle with care.

7. **This kit is intended for research use only. Not for use in diagnostic procedure.**

Storage and Stability

All kit components must be stored at 2-8 °C. All reagents are stable for 6 months after manufacturing when stored at the conditions indicated.

-6-

Performance Characteristics

~ **Sensitivity**

The sensitivity of the assay is 12.5 pg/mL.

The minimum detection limit estimated by serial dilution was 12.5 pg/mL since the mean +2

S.D. of the 6.25 pg/mL was lower than the mean -2 S.D. of the 12.5 pg/mL.

~ **Reproducibility**

1. Intra-assay

Intra-assay reproducibility was determined by assaying the sera 8 times. IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of

results in assay procedure.

Sample serum1 serum2 serum3 serum4 serum5

Number of determinations 8 8 8 8 8

Mean (pg/mL) 2765.5 600.7 345.5 136.1 69.7

C.V. (%) 5.03 4.93 10.80 5.61 9.92

2. Inter-assay

Inter-assay reproducibility was determined by 5 independent assays of the sera. IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of

results in assay procedure.

Sample serum1 serum2 serum3 serum4 serum5

Number of determinations 6 6 6 6 6

Mean (pg/mL)* 2621.1 773.2 615.1 236.4 160.1

C.V. (%) 10.07 8.54 5.21 7.60 6.25

*From six (6) replicates of each serum sample in five (5) separate assays.

-7-

Recovery test

Recombinant human IL-18 was added to samples at different concentrations. IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of results

in assay procedure.

Serum 1

(A) (B) (B/A)

Additional rhIL-18*

(pg/mL)

IL-18 concentration

observed (pg/mL) Recovery (pg/mL) Recovery (%)

0.0 940.8 - -

684.9 1583.0 642.2 94

1346.9 2179.0 1238.2 92

2354.1 3528.7 2587.9 110

*rhIL-18 is abbreviation of recombinant human IL-18.

Serum 2

(A) (B) (B/A)

Additional rhIL-18*

(pg/mL)

IL-18 concentration

observed (pg/mL) Recovery (pg/mL) Recovery (%)

0.0 868.9 - -

684.9 1418.6 549.8 80

1346.9 2035.9 1167.0 87

2354.1 3431.3 2564.2 109

*rhIL-18 is abbreviation of recombinant human IL-18.

Serum 3

(A) (B) (B/A)

Additional rhIL-18*

(pg/mL)

IL-18 concentration

observed (pg/mL) Recovery (pg/mL) Recovery (%)

0.0 629.3 - -

684.9 1334.7 705.4 103

1346.9 1913.4 1284.1 95
2354.1 3282.3 2653.1 113

*rhIL-18 is abbreviation of recombinant human IL-18.

-8-

Dilution test

Sample was diluted with Assay diluent.

Each serum sample was serially diluted from 1/1 to 1/32 with Assay diluent, then IL-18 concentrations of the serum samples were calculated as described in calculation of results in assay procedure.

0

500

1000

1500

2000

2500

3000

Dilution

conc. (pg/mL)

Serum1

Serum2

Serum3

1 1/2 0

REFERENCE:

Okamura H., et al. Nature 378, 88-91 (1995)

Ushio S., et al. J. Immunol. 156, 4274-4279 (1996)

Micallef M., et al. Eur. J. Immunol. 26, 1647-1651 (1996)

Tao D, et al. Cell Immunol. 173, 230-235 (1998)

M. Taniguchi, et al. J. Immunol. methods 206, 107-113 (1997)

MBL is an exclusive licensee (in research field) of the patents owned by Hayashibara Biochemical Labs., Inc.

-9-

MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

5F Sumitomoshoji Marunouchi Bldg., 5-10 Marunouchi 3 chome, Naka-ku, Nagoya

460-0002 Japan

Tel. (052)971-2081 Fax. (052)971-2337

Método: [Quimiluminescente \(Sistema IMMULITE\)](#)

Linha: [Fertilidade](#)

Produto Genérico: [Estradiol](#)

Produto Específico: Estradiol IMMULITE 2000

O Estradiol IMMULITE 2000 é um ensaio em fase sólida, com dois sítios, tipo enzima-imunométrico, quimiluminescente, para ser usado com Analisador Automatizado Immulite 2000, desenvolvido para a determinação quantitativa do estradiol no soro. É estritamente produzido para diagnóstico *in vitro*, usado como um testes conjunto auxiliar na avaliação dos pacientes com várias desordens dos hormônios sexuais.

Princípios do Procedimento

Imunoensaio Competitivo

Ciclos de Incubação: 2 ciclos de 30 minutos cada.

Automação

O sistema IMMULITE 2000 automaticamente manuseia a amostra, as adições de reagentes, os passos de incubação, separação e a mensuração da emissão de fótons pelo luminômetro com temperatura controlada. O sistema calcula os resultados dos testes para amostras dos pacientes e controles em função do sinal observado, usando uma curva padrão armazenada. Gera um relatório impresso que inclui todas as demais informações dos pacientes previamente inseridas via computador.

Faixa de Calibração

O kit de Estradiol IMMULITE 2000, possui uma faixa de calibração de 20 a 2.000 pg/ml (73 a 7.342 pmol/ml).

Coleta do material

O paciente não necessita estar em jejum e nenhuma preparação especial é necessária. Coletar o sangue por punção venosa, evitando-se a hemólise, em tubos comuns (sem anticoagulante), anotando-se a hora da coleta e separar o soro das células. Para punção venosa, ver documento do NCCLS H3-A3, 1991. Nem a bilirrubina ou a hemólise possuem qualquer efeito clinicamente significativo no ensaio de Estradiol IMMULITE 2000. No entanto as amostra hemolisadas podem indicar um mal tratamento dos espécimes antes da sua recepção pelo Laboratório; daí estes resultados devem ser interpretados com cautela. Recomenda-se o uso de ultracentrífuga para a clarificação de amostras lipêmicas.

Sensibilidade Analítica: 10 pg/ml (37 pmol/l).

Volume Utilizado

Uma única determinação utiliza 25 µl de soro.

Valores Esperados

Baseado na sua relação com o kit de Estradiol IMMULITE da DPC (ver método de comparação), do procedimento de Estradiol IMMULITE 2000, pode-se esperar possuir essencialmente as mesmas faixas de referências. As faixas de referências foram geradas usando-se o estradiol IMMULITE em um estudo multinacional, envolvendo mulheres aparentemente saudáveis (idade: 16 - 44 anos), voluntárias e que tiveram suas amostras de sangue coletadas em base diária, ao longo de um ciclo ovulatório completo.

Estradiol em pg/ml			
CICLOS OVULATÓRIOS	n*	MEDIANA	CENTRAL 95%
Fase Folicular	54 (708)	42	ND - 160
Fase Folicular Dias 2 ao 3	54 (108)	31	ND - 84
Perí Ovulatório +- 3 dias	54 (378)	133	34 - 400
Fase Lutea	54 (604)	93	27 - 246

*Número de indivíduos (número total de resultados)

Estradiol em pmol/l			
CICLOS OVULATÓRIOS	n*	MEDIANA	CENTRAL 95%
Fase Folicular	54 (708)	154	ND - 587

Fase Folicular Dias 2 ao 3	54 (108)	114	ND - 308
Perí Ovulatório +- 3 dias	54 (378)	489	124 - 1468
Fase Lutea	54 (604)	343	101 - 905

*Número de indivíduos (número total de resultados) Um outro estudo realizado pelo Estradiol IMMULITE gerou os seguintes resultados :

Estradiol em pg/ml				
GRUPO	n	MEDIA	MEDIANA	FAIXA DE 90%
Homens Adultos	50	30.5	29.7	ND - 56
Mulheres Adultas Pós Menopausa Não Tratada	27	ND	ND	ND - 30
Mulheres Adultas Pós Menopausa Tratada	27	ND	ND	ND - 93
Contraceptivos Orais	61	35.2	24.5	ND - 102

ND - Não Detectável

Estradiol em pmol/l				
GRUPO	n	MEDIA	MEDIANA	FAIXA DE 90%
Homens Adultos		112	109	ND - 206
Mulheres Adultas	27	ND	ND	ND - 110
Mulheres Adultas	27	ND	ND	ND - 341
Contraceptivos Orais	61	129	90	ND - 374

ND - Não Detectável

Os valores aqui tabulados são consistentes com o padrão geral de estradiol através da fase ovulatória. Esta faixa de referência com os limites aqui sugeridos por este estudo, devem ser tomados apenas como orientação. Devido as diferenças que podem existir entre laboratórios e localidades com respeito a população, técnica laboratorial e seleção de grupos de referência, é importante que cada laboratório estabeleça seus próprios limites de referência para avaliação diagnóstica dos resultados dos pacientes.

Limitações

Amostras de gestantes - cuidados devem ser tomados quando ensaiar amostras de gestantes para estradiol, pois o nível de estriol em circulação pode estar alto suficiente para interferir.

Amostras de recém-nascidos - O procedimento Estradiol IMMULITE 2000 não foi validado para ensaiar amostras de recém-nascidos: esteróides com reatividade cruzada, incluindo o estriol, circulando em altas concentrações durante este período podem causar resultados elevados espúrios.

PIL2KE2-3

Método: [Quimiluminescente \(Sistema IMMULITE\)](#)

Linha: [Fertilidade](#)

Produto Genérico: [Progesterona](#)

Produto Específico: Progesterona IMMULITE 2000

O Progesterona IMMULITE 2000 é um ensaio em fase sólida, tipo enzimaímunoensaio quimiluminescente, para ser usado com Analisador Automatizado Immulite 2000, desenvolvido para a determinação quantitativa da progesterona, no soro. É estritamente produzido para diagnóstico *in vitro*, usado como um teste auxiliar na diagnóstico e tratamento de desordens dos ovários e placenta.

Princípios do Procedimento

Imunoensaio Competitivo Sequencial

Ciclos de Incubação : 2 ciclos de 30 minutos cada.

Automação

O sistema IMMULITE 2000 automaticamente manuseia a amostra, as adições de reagentes, os passos de incubação, separação e a mensuração da emissão de fótons pelo luminômetro com temperatura controlada. O sistema calcula os resultados dos testes para amostras dos pacientes e controles em função do sinal observado, usando uma curva padrão armazenada. Gera um relatório impresso que inclui todas as demais informações dos pacientes previamente inseridas via computador.

Faixa de Calibração

O kit de Progesterona IMMULITE 2000, possui uma faixa de calibração de 0,2 a 40 ng/ml (0.6 a 127 nmol/l)

Coleta do Material

O paciente não necessita estar em jejum e nenhuma preparação especial é necessária. Coletar o sangue por punção venosa, evitando-se a hemólise, em tubos comuns (sem anticoagulante), anotando-se a hora da coleta e separar o soro das células. Para punção venosa, ver documento do NCCLS H3-A3, 1991. Recomenda-se o uso de ultracentrífuga para a clarificação de amostras lipêmicas.

Volume Utilizado

Uma única determinação utiliza 50µl de soro.

Sensibilidade Analítica : 0.2 ng/ml (0.6 nmol/l)

Valores Esperados

Baseado em sua relação com o kit de Progesterona IMMULITE da DPC, as seguintes faixas de referência foram estabelecidas para o procedimento do kit Progesterona IMMULITE 2000, em ng/mL e nmol/L.

As faixas de referências foram geradas usando-se o kit de Progesterona IMMULITE em um estudo multinacional envolvendo mulheres em aparente bom estado de saúde (idade 16-44 anos), voluntárias, e tiveram amostras coletadas em base diária ao longo de um ciclo ovulatório completo.

Progesterona em ng/ml

Ciclos Ovulatórios	N*	Mediana	Central 95%
Fase Folicular	54 (762)	0.8	0.32 - 2.0
Meio de Ciclo	54 (54)	1.4	0.77 - 2.3
Fase Lutea	54 (658)	8.7	1.19 - 21.6
Meio de Fase Lutea			
Dias 7 a 8	54 (108)	13.0	4.4 - 28
5 a 6 dias antes da menstruação	54 (108)	11.6	4.4 - 21

N*- Número de Indivíduos (Número Total de Resultados)

Progesterona em ng/ml

Ciclos Ovulatórios	N*	Mediana	Central 95%
Fase Folicular	54 (762)	2.4	1.0 - 6.3
Meio de Ciclo	54 (54)	4.5	2.5 - 7.4
Fase Lutea	54 (658)	28	3.8 - 69
Meio de Fase Lutea			
Dias 7 a 8	54 (108)	41	13.9 - 90
5 a 6 dias antes da menstruação	54 (108)	37	14.1 - 66

N*- Número de Indivíduos (Número Total de Resultados)

Um outro estudo realizado com a Progesterona IMMULITE® gerou os seguintes resultados :

Progesterona em ng/ml

Unidade de Massa (nmol/l)	Mediana	Faixa Absoluta	N
Homens	0.52	0.27 - 0.90	63
Mulheres			
Fase Folicular	0.67	0.33 - 1.2	29
Fase Lutea	4.8	0.72 - 17.8	29
Pós Menopausa	0.36	ND - 1.0	34
Contraceptivos Orais	0.70	0.34 - 0.92	19
Mulheres Grávidas			
Primeiro Trimestre	22.2	9.3 - 33.2	28
Segundo Trimestre	35.4	29.5 - 50.0	18
Terceiro Trimestre	102	83.1 - 160	8

Um outro estudo realizado com a Progesterona IMMULITE® gerou os seguintes resultados :

Progesterona em ng/ml

Unidades S.I (nmol/l)	Mediana	Faixa Absoluta	N
Homens	1.7	0.86 - 2.9	63
Mulheres			
Fase Folicular	2.1	1.0 - 3.8	29
Fase Lutea	2.3	2.3 - 56.6	29
Pós Menopausa	1.1	ND - 3.2	34
Contraceptivos Orais	2.2	1.1 - 2.9	19M
Mulheres Grávidas			
Primeiro Trimestre	70.6	29.6 - 106	28
Segundo Trimestre	113	93.8 - 159	18
Terceiro Trimestre	324	264 - 509	8

ND - Não Detectável

Na gravidez, a tendência geral é de um aumento de valores. Há uma variação interpessoal considerável nos valores de progesterona, particularmente nos grupos associados com níveis elevados (notar que a mensuração do nível de progesterona é geralmente considerado inadequado para a monitoração do bem estar fetal nas últimas semanas de gravidez). Um estudo de valores em "fertilidade" pediátrica realizado com a progesterona IMMULITE® em uma Clínica dos EUA, gerou os seguintes resultados :

Progesterona em ng/ml

GRUPO	IDADE(Anos)	N	MEDIANA	CENTRAL 95%
Mulheres	Cordão	27	570	485 - 755

	0.1 - 0.4	24	1.2	0.25 - 17.0
	0.5 - 1.0	19	0.8	0.2 - 1.6
	1.1 - 9.0	38	0.4	ND - 1.4
Homens	Cordão	27	520	345 - 650
	0.1 - 0.4	33	1.5	0.3 - 14.0
	0.5 - 1.0	33	1.5	ND - 2.0
	1.1 - 9.0	42	0.4	ND - 1.3
Combinado	Cordão	54	550	350 - 750
	0.1 - 0.4	57	1.5	0.25 - 17.0
	0.5 - 1.0	33	0.8	ND - 2.0
	1.1 - 9.0	38	103	ND - 4.5

ND - Não Detectável

Progesterona em ng/ml

GRUPO	IDADE(Anos)	N	MEDIANA	CENTRAL 95%
Mulheres	Cordão	27	1813	1479 - 2401
	0.1 - 0.4	24	3.8	0.8 - 54
	0.5 - 1.0	19	2.5	0.6 - 5.1
	1.1 - 9.0	38	1.3	ND - 4.5
Homens	Cordão	27	1654	1097-2067
	0.1 - 0.4	33	4.8	1.0 - 4.5
	0.5 - 1.0	14	2.5	ND - 6.4
	1.1 - 9.0	42	1.3	ND - 4.1
Combinado	Cordão	54	1749	350 - 750
	0.1 - 0.4	57	4.8	0.8 - 54
	0.5 - 1.0	33	2.5	ND - 6.4
	1.1 - 9.0	80	1.3	ND - 4.1

ND - Não Detectável

Método: [Quimiluminescente \(Sistema IMMULITE\)](#)

Linha: [Fertilidade](#)

Produto Genérico: [Prolactina](#)

Produto Específico: Prolactina IMMULITE 2000

Descrição

Para uso diagnóstico in vitro com o equipamento IMMULITE 2000 para a mensuração quantitativo da Prolactina em soro, como um auxiliar no diagnóstico e tratamento dos distúrbios da pituitária.

Princípios do Procedimento: Ensaio Imunométrico

Ciclos de Incubação: 1 x 30min

Coleta do material:

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de pacientes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Volume de Amostra: 25 L de soro

Valores de Referência:

Baseado na sua relação com a Prolactina IMMULITE da DPC (ver comparação de métodos), pode esperar-se que o ensaio tenha valores de referência idênticos.

Grupo	n*	Mediana	Central 96%
Homens adultos	19	6,2 ng/ml 131 mIU/l	2,5 – 17 53 – 360

Um estudo realizado com a Prolactina IMMULITE forneceu os seguintes resultados:

Grupo	n*	Mediana	Central 95%
Mulheres adultas	115	9,4 ng/ml 199 mIU/l	1,9 – 25 40 – 530

Como sumarizado no Relatório Técnico da DPC ZB 157, este estudo acompanhou mulheres normalmente ovulantes em base diária ao longo de um ciclo completo, nos quais foram obtidos alguns valores altos e também consistente com aumento de stress na coleta da amostra.

Um estudo cruzado de valores de fertilidade pediátricos realizado com a Prolactina IMMULITE numa clínica de “parto” no sudoeste dos EUA, forneceu os seguintes resultados.

Prolactina ng/ml

Grupo	Idade (anos)	n	Media	Central 95%
Mulheres	Cordão	28	380	200 – 675
	0,1 – 0,5	28	15	1 – 140
	0,6 – 9	55	11	2 – 43
Homens	Cordão	27	295	155 – 565
	0,1 – 0,5	36	19	4 – 65
	0,6 – 9	55	8	0,6 – 29
Combinado	Cordão	55	340	160 – 665
	0,1 – 0,5	64	117	2 – 125
	0,6 - 9	110	9	1 - 40

Prolactina mIU/l

Grupo	Idade (anos)	n	Media	Central 95%
Mulheres	Cordão	28	8056	4240 – 14310
	0,1 – 0,5	28	318	21 – 2968
	0,6 – 9	55	233	42 – 912
Homens	Cordão	27	6254	3180 – 11978
	0,1 – 0,5	36	403	85 – 1378
	0,6 – 9	55	170	13 – 615
Combinado	Cordão	55	7208	3392 – 14098
	0,1 – 0,5	64	2480	42 – 2650
	0,6 - 9	110	191	21 – 848

Estes valores devem ser considerados apenas como diretrizes. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores.

Limitações

Os anticorpos heterofílicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoensaios in vitro.[Ver Boscato LM, Stuart MC, Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998; 34: 27 – 33]. Amostras de pacientes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anormais. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interações entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do paciente e outros achados que possam correlacionar.

Calibração: Até 150 ng/ml (até 3.180 mIU/L)

Sensibilidade Analítica: 0,16 ng/ml (3,4 mIU/L)

G561c Glitz, Cristina Luce

Concentração sérica e peritoneal da interleucina-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve / Cristina Luce Glitz ; orient. João Sabino Lahorgue Cunha Filho. – 2006.

94 f. ; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Endometriose 2. Infertilidade feminina 3.

Interleucina-18 I. Cunha Filho, João Sabino Lahorgue

II. Título.

NLM: WP 390

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA