

Como citar este artigo:

Hernandes C, Gueuvoghlian-Silva BY, Monnaka VU, Ribeiro NM, Pereira WO, Podgaec S. Células T reguladoras isoladas do fluido peritoneal de mulheres com endometriose expressam um número diferente de receptores do tipo Toll. *einstein* (São Paulo). 2020;18:eAO5294. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO5294

Autor correspondente:

Camila Hernandez
Instituto Israelita de Ensino e
Pesquisa Albert Einstein
Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi
CEP: 05652-900 – São Paulo, SP, Brasil
Tel.: (11) 2151-1031
E-mail: camila.hernandes@einstein.br

Data de submissão:

6/8/2019

Data de aceite:

9/2/2020

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2020



Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

ARTIGO ORIGINAL

Células T reguladoras isoladas do fluido peritoneal de mulheres com endometriose expressam um número diferente de receptores do tipo Toll

Regulatory T cells isolated from endometriotic peritoneal fluid express a different number of Toll-like receptors

Camila Hernandez¹, Bárbara Yasmin Gueuvoghlian-Silva², Vitor Ulisses Monnaka³,
Natalia Mazini Ribeiro², Welbert de Oliveira Pereira¹, Sérgio Podgaec¹

¹ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

² Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

³ Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

DOI: [10.31744/einstein_journal/2020AO5294](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO5294)

RESUMO

Objetivo: Analisar e comparar a expressão de receptores do tipo Toll por células T reguladoras presentes no líquido peritoneal de pacientes com endometriose. **Métodos:** Células T reguladoras foram isoladas do líquido peritoneal de mulheres com e sem endometriose, coletadas durante a cirurgia, e o RNAm foi extraído para análise da expressão de receptores do tipo Toll por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa. **Resultados:** Pacientes com endometriose apresentaram células T reguladoras expressando maior número e variedade de Toll por células quando comparadas com T reguladoras de pacientes do Grupo Controle. Receptores do tipo Toll-1 e receptores do tipo Toll-2 foram expressos em ambos os grupos. Todos os outros tipos de receptores Toll foram encontrados expressos apenas em células T reguladoras do grupo com endometriose. **Conclusão:** Pacientes com endometriose apresentaram células T reguladoras peritoneais expressando vários tipos de receptores tipo Toll.

Descritores: Linfócitos T reguladores; Receptores toll-like; Sistema imunitário; Endometriose

ABSTRACT

Objective: To analyze and compare the expression of Toll-like receptors by regulatory T cells present in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. **Methods:** Regulatory T cells were isolated from peritoneal fluid of women with and without endometriosis, collected during surgery, and mRNA was extracted for analysis of Toll-like receptors expression by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **Results:** Patients with endometriosis presented regulatory T cells expressing a larger number and variety of Toll-like receptors when compared to regulatory T cells from patients in the Control Group. Toll-like receptor-1 and Toll-like receptor-2 in regulatory T cells were expressed in both groups. All other expressed Toll-like receptors types were only found in regulatory T cells from the Endometriosis Group. **Conclusion:** Patients with endometriosis had peritoneal regulatory T cells expressing various Toll-like receptors types.

Keywords: T-lymphocytes, regulatory; Toll-like receptors; Immune system; Endometriosis

INTRODUÇÃO

A patogênese da endometriose permanece incerta.^(1,2) A teoria mais aceita é a de Sampson,⁽³⁾ a qual propõe que, durante a menstruação, as células endometriais

são transportadas pelas tubas uterinas por fluxo reverso até a cavidade peritoneal, onde aderem às superfícies da serosa. No entanto, embora a menstruação retrógrada ocorra em 90% das mulheres, apenas cerca de 10% são acometidas pela endometriose.^(4,5) Devido a essa discrepância, teorias complementares sugerem que a resposta imunológica de pacientes com endometriose fica alterada e não consegue eliminar os implantes endometriais ectópicos.⁽⁶⁻¹⁰⁾

Por exemplo, os linfócitos T reguladores (Treg) são uma subpopulação de linfócitos T especializados na regulação da resposta imune, que já foram implicados no surgimento da endometriose.⁽⁹⁾

Embora as células Treg estejam associados à produção de citocinas anti-inflamatórias, há evidências de que, sob condições inflamatórias, eles também expressam citocinas inflamatórias e, quando desregulados, contribuem para a manutenção da doença.⁽¹¹⁾

Recentemente, uma nova teoria foi proposta, associando a presença de microrganismos ao desenvolvimento da endometriose.^(11,12) Essa teoria parte de estudos que indicam uma maior contaminação bacteriana no sangue menstrual, principalmente por *Escherichia coli*, e maiores níveis de endotoxina no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, em comparação a pacientes sem a doença.^(11,13) Outro estudo mostrou que, em mulheres com endometriose, a presença de *Mycoplasma genitalium* é associada com a regulação negativa de genes relacionados à resposta inflamatória.⁽¹⁴⁾ A ideia é que, durante a menstruação retrógrada, tecido endometrial e microrganismos são carregados para a cavidade peritoneal,⁽¹²⁾ com posterior adesão, proliferação, diferenciação e invasão por essas células.⁽²⁾

Estudos sugerem que microrganismos podem ser diretamente detectados pelos linfócitos Treg por meio dos receptores do tipo Toll (TLRs), capazes de modular as funções supressoras dos Tregs, e essa função supressora dos linfócitos Treg pode ser potencializada ou revertida pelos TLRs.⁽¹⁵⁾

Considerando-se que mulheres com endometriose, de fato, apresentam mais microrganismos na cavidade peritoneal que mulheres saudáveis, e os microrganismos expressam e secretam agonistas de TLR, que poderiam afetar os linfócitos Treg, nossa hipótese é a de que há uma diferença entre a expressão de TLR em linfócitos Treg isolados de pacientes com endometriose em comparação aos controles.

OBJETIVO

Analisar e comparar a expressão de receptores do tipo Toll por células T reguladoras isoladas de fluido peritoneal

obtidos de pacientes com endometriose e de mulheres sem endometriose.

MÉTODOS

População do estudo

Este estudo de caso-controle foi realizado no Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), em São Paulo (SP), de 1º de janeiro a 1º de dezembro de 2018. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HIAE, número 563.939, CAAE: 25915014.2.0000.0071, e todas as pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Informado. As pacientes foram divididas em dois grupos com base nos achados cirúrgicos: com e sem endometriose. O diagnóstico de endometriose dependia da observação de lesões características durante a cirurgia e posterior confirmação por histologia. O Grupo Controle foi composto por mulheres sem qualquer evidência de endometriose, que tinham sido operadas por cistos benignos de ovário, miomas uterinos, laparoscopia diagnóstica ou laqueadura.

Foram incluídas 29 pacientes neste estudo: 23 com endometriose e 6 controles. Os critérios de inclusão foram mulheres com idade entre 18 e 40 anos com ciclos eumenostrícos, submetidas à cirurgia laparoscópica (para confirmar ou excluir endometriose). Os critérios de exclusão foram mulheres com doença autoimune, inflamatória e/ou neoplásica e/ou em terapia hormonal, incluindo análogos do hormônio de liberação de gonadotrofinas (GnRH), progestinas ou anticoncepcionais combinados, por 3 meses antes da cirurgia.

Para coleta de amostras, logo após a passagem do trocarte auxiliar na cirurgia laparoscópica, todo o fluido peritoneal depositado na escavação retouterina anterior e/ou posterior foi coletado com uma agulha laparoscópica.

As pacientes foram caracterizadas clinicamente pela presença de dispareunia profunda, dismenorreia, dor pélvica crônica, abortos, infertilidade, fase do ciclo menstrual, idade, etnia e índice de massa corporal (IMC). A dismenorreia foi medida por meio da Escala Visual Analógica (VAS), uma escala validada na qual uma linha de 10cm representa uma graduação entre “nenhuma dor” e “pior dor”.

Isolamento e caracterização de linfócitos T reguladores provenientes do fluido peritoneal

O fluido peritoneal foi processado para que os linfócitos fossem isolados. Os eritrócitos foram lisados com tampão de lise em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, os linfócitos foram lavados com

tampão fosfato-salino (PBS), contados e congelados em soro fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) com dime-tilsulfóxido (DMSO) a 10% (Sigma-Aldrich, USA) e criopreservados em nitrogênio líquido até o uso, quando foram descongelados sob agitação em banho-maria a 37°C. Os linfócitos foram lavados por centrifugação (250g, 8 minutos, 8°C) inicialmente com 0,01M PBS, pH 7,2, seguido por uma segunda lavagem em meio de cultura (R-10) (Invitrogen-Gibco, Gaithersburg, MD, USA). Depois, as células foram suspensas em meio R-10 para contagem e avaliação da viabilidade celular em um contador de células automático Countess™. O CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} regulatory T Cell Isolation Kit II (MACS, MiltenyiBiotec, Auburn, CA, USA) foi usado para separar as células de acordo com as instruções do fabricante. Rapidamente, os linfócitos não CD4⁺ e CD127^{high} foram marcados com um coquetel de anticorpos conjugados com biotina (CD8, CD19, CD123 e CD127) e submetidos à separação magnética. Esta fração enriquecida de linfócitos T CD4⁺ foi marcada com anticorpos anti-CD25 e depois, novamente, submetida à separação magnética. Os Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}) foram eluídos como a fração de células selecionadas positivamente. As amostras foram centrifugadas, suspensas em 200µL de Trizol (reagente TRIzol®, Invitrogen) e congeladas a -80°C para extração total do ácido ribonucleico (RNA).

Extração de RNA e teste de expressão do RNA mensageiro

O RNA total dos Tregs isolados foi extraído de acordo com um protocolo padrão de isolamento com Trizol e purificado (Rneasy Micro Kit™, Qiagen, Dusseldorf, Germany). A concentração de RNA foi determinada usando-se um espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Australia). Todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

Foi realizada síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) por transcrição reversa usando-se o *kit* específico ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). As amostras foram incubadas com o volume específico de Random Primer a 70°C por 5 minutos e, depois, colocadas em gelo por 5 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas brevemente e deixadas em gelo até a conclusão do próximo passo. Uma mistura de reagentes contendo desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), MgCl₂, transcriptase reversa ImProm-II (Promega) e tampão de reação ImProm-II™ 5x (Promega) foi preparada, adicionada ao RNA com Random Primer e incubada a 25°C por

5 minutos, 42°C por 60 minutos, seguida por 10 minutos a 70°C. Os cDNAs resultantes foram armazenados a -20°C. Todas as reações foram realizadas a uma concentração de RNA de 20ng/mL.

Uma pré-amplificação complementar de ácido desoxirribonucleico foi realizada utilizando-se uma mistura de reagentes composta pelos testes Taqman de expressão gênica (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e tampão TE para completar o volume. Tubos com a mistura de reagentes, amostras de cDNA e o Master Mix Pre-Amp (Applied Biosystems) foram incubados a 95°C por 10 minutos e, depois, por dez ciclos de 95°C por 15 minutos, seguidos por 4 minutos a 60°C. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

A expressão de RNA mensageiro foi determinada por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) em um sistema de detecção de sequências ABI 7500 (Applied Biosystems). A reação em cadeia da polimerase foi realizada em tubos separados para cada reação, e cada amostra foi processada em duplicata. Foram usados testes TaqMan de expressão gênica (Applied Biosystems) para os genes-alvo TLR1 (Hs00413978_m1), TLR2 (Hs00610101_m1), TLR3 (Hs01551078_m1), TLR4 (Hs00152939_m1), TLR5 (Hs00152825_m1), TLR6 (Hs00271977_s1), TLR7 (Hs00152971_m1), TLR8 (Hs00152972_m1) e TLR9 (Hs00152973_m1).

Análise estatística

As análises de dados foram realizadas no programa estatístico R. O nível de significância de 0,05 foi adotado para todas as comparações.

A distribuição de dados e variações de todas as variáveis contínuas foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e F, respectivamente. Considerando-se essas análises e o tamanho pequeno da amostra, foram usados testes não paramétricos. Para avaliar diferenças clínicas entre os grupos que poderiam influenciar nos resultados, comparou-se a presença de dispareunia profunda, dismenorreia, dor pélvica crônica, abortos, infertilidade, fase do ciclo menstrual, idade, etnia e IMC. Abortos, dispareunia profunda e dor pélvica crônica foram comparadas pelo teste exato de Fisher, considerando-se o pequeno tamanho da amostra e a tabela 2x2. Etnia, fase menstrual e infertilidade foram comparados pelo teste χ^2 . Idade, IMC e dismenorreia foram comparados pelo teste de soma de postos de Wilcoxon. Como não havia dados sobre etnia de quatro pacientes e sobre IMC de cinco pacientes, a análise foi realizada com os dados disponíveis.

A expressão de TLR em células Treg do fluido peritoneal dos Grupos de Endometriose e Controle foi analisada qualitativamente considerando-se o valor de limiar do ciclo (em inglês, *cycle threshold*, ou CT) de 32 para categorização da expressão dos receptores em uma variável binária qualitativa, “expresso” ou “não expresso”.

Em seguida, comparamos a expressão de TLRs específicos em cada grupo. Também avaliamos a expressão de TLR de acordo com o tipo de endometriose. Em ambos os casos, foi usado o teste exato de Fisher. O número de TLRs expressos em cada grupo foi comparado pelo teste de soma de postos de Wilcoxon. Considerando-se a menor eficiência deste método para amostras pequenas, incluímos também o teste *t* de Student. A correlação entre o número de TLRs expressos e a idade das pacientes com endometriose foi analisada pelo teste de Spearman.

RESULTADOS

Parâmetros clínicos

As características clínicas são apresentadas na tabela 1. Infertilidade foi reportada por 14 pacientes no Grupo de Endometriose e duas nos controles ($p=0,019$). A média para dismenorria na EVA foi 8,37 no Grupo de Endometriose e 5,83 nos controles ($p=0,027$). Não houve diferença entre os grupos para os outros parâmetros clínicos.

Tabela 1. Características iniciais de pacientes com endometriose e controles

Parâmetros	Controle	Endometriose	Valor de p
Pacientes	6	23	
Idade	34,7	34,5	0,765
Fase menstrual			0,200
Menstrual	0	2	
Proliferativa	4	5	
Secretória	1	9	
Desconhecida	1	7	
Dismenorria	5,83	8,39	0,027
Dor pélvica crônica	2	15	0,198
Dispareunia profunda	2	14	0,364
Infertilidade			0,019
Sim	2	14	
Não	4	3	
Desconhecida	0	6	
Abortos	1	4	1

Resultados expressos por n ou média.

Dismenorria: média na Escala Visual Analógica. Abortos, dispareunia profunda e dor pélvica crônica foram comparados pelo teste exato de Fisher; fase menstrual e infertilidade, pelo teste χ^2 ; idade e dismenorria, pelo teste de soma dos postos de Wilcoxon.

Expressão de receptores do tipo Toll

A expressão de TLRs nos linfócitos Treg obtidos do fluido peritoneal foi resumida na tabela 2. No Grupo Controle, três das seis mulheres não expressaram nenhum TLR em Tregs peritoneais, uma expressou apenas TLR1, e duas expressaram apenas TLR2. A expressão de TLR 3 a 9 por linfócitos Treg peritoneais foi negativa em todos os indivíduos do Grupo Controle.

Tabela 2. Expressão de receptores do tipo Toll por linfócitos T reguladores peritoneais de pacientes com endometriose e controles

TLR	Endometriose	Controle	Valor de p
TLR	12/23 (52,2)	3/6 (50,0)	1,000
TLR1	8/23 (34,8)	1/6 (16,7)	0,633
TLR2	12/23 (52,2)	2/6 (33,3)	0,651
TLR3	1/23 (4,3)	0/6 (0,0)	1,000
TLR4	5/23 (21,7)	0/6 (0,0)	0,553
TLR5	6/23 (26,1)	0/6 (0,0)	0,295
TLR6	2/23 (8,7)	0/6 (0,0)	1,000
TLR7	5/23 (21,7)	0/6 (0,0)	0,553
TLR8	3/23 (13,0)	0/6 (0,0)	1,000
TLR9	0/23 (0,0)	0/6 (0,0)	-

Resultados expressos pela (%) de mulheres dentro do grupo com e sem endometriose cujas células Treg apresentaram expressão de determinado tipo de TLR.

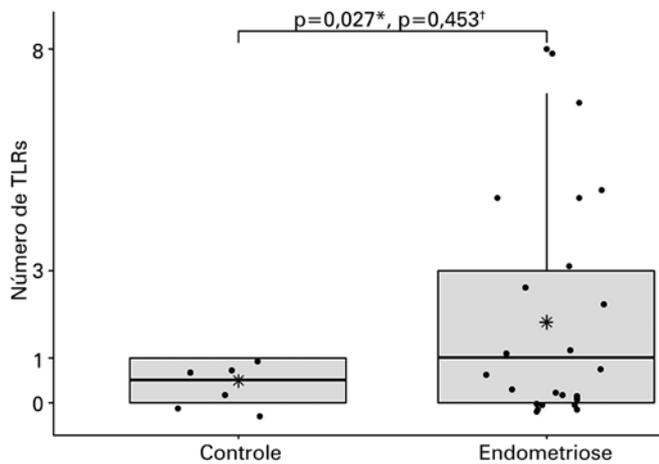
A expressão de um receptor Toll específico na população de linfócitos T reguladores peritoneais foi considerada positiva (+: variável binária, qualitativa), considerando-se o valor limiar do ciclo de 32. Receptores do tipo Toll comparados pelo teste exato de Fisher. TLR: receptores do tipo Toll.

No Grupo de Endometriose, sete pacientes apresentaram Tregs peritoneais com expressão de três ou mais TLRs, sendo TLR5 o mais frequente (em seis de sete pacientes). Quatro pacientes expressaram apenas TLR2, uma paciente expressou tanto TLR1 quanto TLR2, e em 11 pacientes, os Tregs peritoneais não expressaram TLR.

Exceto pelo TLR9, foi observada expressão de todos os TLRs (sozinhos ou coexpressos) em Tregs de pacientes com endometriose.

Não foi identificada associação na avaliação da expressão de TLR específicos em cada grupo, nem de acordo com o tipo de endometriose.

A comparação do número de TLR entre os Grupos de Endometriose e Controle deveria sugerir que a presença da endometriose pode estar relacionada à expressão de um maior número de receptores (Figura 1). Como o número de TLR expressos não mostrou distribuição normal nem variâncias homogêneas e considerando-se o tamanho pequeno da amostra, o teste de soma de pontos de Wilcoxon foi usado, mas não foram observados resultados estatisticamente significativos ($p=0,453$). Tendo em vista a eficiência mais baixa desse método com amostras menores, incluímos também o teste *t* de Student, que mostrou diferença estatística-



* Teste t de Student; † teste de soma de postos de Wilcoxon. TLR: receptores do tipo Toll.

Figura 1. Número de receptores do tipo Toll expressos em células T reguladoras isoladas dos Grupos Endometriose e Controle

mente significativa ($p=0,027$). Nenhuma correlação foi identificada (dados não mostrados) na avaliação do número de TLRs expressos, de acordo com a idade das pacientes com endometriose.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou a expressão de diferentes TLRs em células Treg isoladas do fluido peritoneal de pacientes com e sem endometriose.

Os resultados mostram que pacientes com endometriose apresentaram células Treg com expressão de maior número e variedade de TLRs em comparação aos linfócitos Treg de pacientes do Grupo Controle. TLR1 e TLR2 foram expressos pelos linfócitos Treg em ambos os grupos. Todos os outros tipos de TLRs foram encontrados somente em Tregs do Grupo de Endometriose, embora só tenha sido possível identificar essa expressão em cerca de 33% (7 de 23) das pacientes com endometriose. A avaliação quantitativa do número total de receptores expressos demonstrou que o Grupo de Endometriose apresenta um número maior de TLRs em relação aos controles, usando-se análise paramétrica, devido à eficiência desta para amostras pequenas.⁽¹⁶⁾ Assim, a expressão de diferentes receptores sugere um efeito cumulativo sobre o balanço da resposta imune. Além disso, o TLR5 foi encontrado apenas em pacientes que expressavam três ou mais TLRs diferentes, correspondendo a seis de sete pacientes.

Para respostas mais conclusivas, este estudo deveria ter analisado mais pacientes, e o tamanho pequeno da amostra é sua principal limitação.

As células Treg são uma subpopulação de células T que mantêm a autotolerância imunológica e a homeos-

tase, controlam a supressão da resposta imune excessiva ao hospedeiro,⁽¹⁶⁾ e supostamente influenciam no comprometimento imunológico observado na endometriose.⁽⁷⁻¹⁰⁾ Os TLRs são proteínas transmembrana localizadas na superfície das células ou na parede do endossomo, responsáveis por induzir a expressão de vários mecanismos de defesa do hospedeiro.^(15,17) Alguns estudos sugeriram que microrganismos podem ser diretamente detectados por linfócitos Treg por meio dos TLRs,^(18,19) receptores capazes de modular a função supressora dos Tregs,⁽¹⁹⁻²⁴⁾ e que essa função supressora das células Treg pode, supostamente, ser potencializada ou revertida pelos agonistas de TLR.⁽¹⁹⁾

A maior variedade de tipos de TLRs expressos por Tregs presentes na cavidade peritoneal de pacientes com endometriose poderia sugerir uma suposta estimulação das células-alvo por microrganismos. Estes, teoricamente, chegariam à cavidade peritoneal pela menstruação retrógrada.⁽¹²⁾

Os agonistas de receptores Toll presentes nos microrganismos podem influenciar nas funções dos linfócitos Treg.^(19,24) Os agonistas de TLR2 e TLR8 podem inibir a função supressora dos linfócitos Treg, enquanto os agonistas de TLR4 e TLR5 podem ter o efeito oposto.⁽¹⁹⁾ Como os microrganismos não foram isolados, não foi possível avaliar sua associação direta com o fenótipo dos Treg, mas pode-se supor que, pelo menos para algumas das mulheres acometidas pela endometriose, a presença de microrganismos na cavidade peritoneal poderia modificar, por meio dos Tregs, o balanço entre as populações de células imunes ou inflamatórias. O desequilíbrio em direção a um microambiente mais tolerogênico prejudicaria a eliminação normal das células endometriais carregadas para a cavidade peritoneal.

CONCLUSÃO

Embora um grupo de pacientes com endometriose tenha apresentado células T reguladoras peritoneais com expressão de receptores do tipo Toll em maior número e variedade em comparação ao tipo correspondente no Grupo Controle, a análise não foi capaz de alcançar significância estatística. Assim, é necessário um estudo com coortes maiores de pacientes para comprovar nossa hipótese e investigar alterações fenotípicas e funcionais em células peritoneais na endometriose.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílios nº. 2013/27092-2 e 2014/08227-7.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Hernandes C: <http://orcid.org/0000-0001-7352-6933>
 Gueuvoghlian-Silva BY: <http://orcid.org/0000-0003-3014-3099>
 Monnaka VU: <http://orcid.org/0000-0001-7313-0437>
 Ribeiro NM: <http://orcid.org/0000-0003-4162-7224>
 Pereira WO: <http://orcid.org/0000-0002-3635-8456>
 Podgaec S: <http://orcid.org/0000-0002-9760-6003>

REFERÊNCIAS

1. Augoulea A, Alexandrou A, Creatsa M, Vrachnis N, Lambrinouadaki I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;286(1):99-103. Review.
2. Klemmt PA, Starzynski-Powitz A. Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis. *Curr Womens Health Rev*. 2018;14(2):106-16. Review.
3. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*. 1927;3(2):93-110.43.
4. Rosa e Silva JC, do Amara VF, Mendonca JL, Rosa e Silva AC, Nakao LS, Poli Neto OB, et al. Serum markers of oxidative stress and endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(4):371-4.
5. Zhang T, De Carolis C, Man GC, Wang CC. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: a literature update. *Autoimmun Rev*. 2018;17(10):945-55. Review.
6. Ación P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol*. 2013;2013:242149.
7. Podgaec S, Rizzo LV, Fernandes LF, Baracat EC, Abrao MS. CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2012;68(4):301-8.
8. Tanaka Y, Mori T, Ito F, Koshiba A, Takaoka O, Kataoka H, et al. Exacerbation of Endometriosis Due To Regulatory T-Cell Dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3206-17.
9. de Barros IB, Malvezzi H, Gueuvoghlian-Silva BY, Piccinato CA, Rizzo LV, Podgaec S. "What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review". *J Reprod Immunol*. 2017;120:48-55. Review. Erratum in: *J Reprod Immunol*. 2017;121:34.
10. Gueuvoghlian-Silva BY, Bellelis P, Barbeiro DF, Hernandez C, Podgaec S. Treg and NK cells related cytokines are associated with deep rectosigmoid endometriosis and clinical symptoms related to the disease. *J Reprod Immunol*. 2018;126:32-8.
11. Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(11):2446-56.
12. Khan KN, Fujishita A, Hiraki K, Kitajima M, Nakashima M, Fushiki S, et al. Bacterial contamination hypothesis: a new concept in endometriosis. *Reprod Med Biol*. 2018;17(2):125-33.
13. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Yamaguchi N, Katamine S, Matsuyama T, et al. Escherichia coli contamination of menstrual blood and effect of bacterial endotoxin on endometriosis. *Fertil Steril*. 2010;94(7):2860-3.e1-3.
14. Campos GB, Marques LM, Rezende IS, Barbosa MS, Abrao MS, Timenetsky J. Mycoplasma genitalium can modulate the local immune response in patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 2018;109(3):549-60.e4.
15. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295-8. Review.
16. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87. Review.
17. Vu A, Calzadilla A, Gidfar S, Calderon-Candelario R, Mirsaedi M. Toll-like receptors in mycobacterial infection. *Eur J Pharmacol*. 2017;808:1-7. Review.
18. van Maren WW, Jacobs JF, de Vries IJ, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology*. 2008;124(4):445-52. Review.
19. Olivier A, Sainz-Perez A, Dong H, Sparwasser T, Majlessi L, Leclerc C. The adjuvant effect of TLR agonists on CD4(+) effector T cells is under the indirect control of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(8):2303-13.
20. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003;197(4):403-11.
21. Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol*. 2004;12(11):484-8.
22. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*. 2005;309(5739):1380-4.
23. LaRosa DF, Gelman AE, Rahman AH, Zhang J, Turka LA, Walsh PT. CpG DNA inhibits CD4+CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells. *Immunol Lett*. 2007;108(2):183-8.
24. Liu G, Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology*. 2007;122(2):149-56. Review.