



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
MESTRADO EM GENÉTICA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE P53 EM PACIENTES COM
CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE ASSOCIADO À INFERTILIDADE**

CIRCONCISTO LAURENTINO RIBEIRO JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética da Universidade Católica de Goiás como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Goiânia, GO

2009



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
MESTRADO EM GENÉTICA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE P53 EM PACIENTES COM
CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE ASSOCIADO À INFERTILIDADE**

CIRCONCISTO LAURENTINO RIBEIRO JÚNIOR

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Goiânia, GO

2009

Dedico este trabalho ao Meu Deus pela capacitação, aos meus pais pelo exemplo de vida e luta, e à minha família (Fabiana, Ana Beatriz e Felipe) pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todos os professores e colegas de mestrado pelo privilégio da convivência e pelos preciosos ensinamentos ministrados.

Ao Dr. Rui Gilberto Ferreira da Clínica Fértil pela parceria nas cirurgias de videolaparoscopia e pela troca de experiências de sempre.

À colega Jalsi T. Arruda e a todos do laboratório que me auxiliaram muito com a parte prática da pesquisa e pelo auxílio durante toda confecção do trabalho.

E de forma especial gostaria de agradecer muitíssimo à Prof^a Dr^a Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura, minha orientadora, que com sua extrema competência e sabedoria me conduziu durante este período importantíssimo da minha formação acadêmica com grande brilhantismo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1-ENDOMETRIOSE.....	14
1.1-INTRODUO.....	14
1.1.1- Definio.....	14
1.1.2- Histrico.....	14
1.2-REVISO LITERRIA.....	15
1.2.1- Epidemiologia.....	15
1.2.1.1- Idade.....	16
1.2.1.2- Antecedentes obsttricos e ginecolgicos.....	16
1.2.1.3- Fumo.....	17
1.2.1.4- Atividade fsica.....	18
1.2.1.5- Antecedentes familiares.....	18
1.2.2- Etiopatogenia.....	19
1.2.2.1- Origem Mlleriana.....	19
1.2.2.2- Metaplasia celmica.....	19
1.2.2.3- Menstruao retrgrada.....	20
1.2.2.4- Disseminao linftica.....	20
1.2.2.5- Disseminao hematognica.....	20
1.2.2.6- Teoria iatrognica.....	20

1.2.2.7- Teoria composta.....	21
1.2.2.8- Fatores endócrinos e parácrinos.....	21
1.2.2.9- Alterações do sistema imunológico.....	21
1.2.2.10- Fatores genéticos.....	22
1.2.3- Endometriose – Diagnóstico.....	25
1.2.3.1- Diagnóstico clínico.....	25
1.2.3.2- Diagnóstico laboratorial.....	27
1.2.3.3- Diagnóstico por imagem.....	28
1.2.4– Endometriose – Classificação.....	40
1.2.5– Endometriose e infertilidade.....	40
1.2.6- Endometriose e tratamento.....	43
1.2.6.1- Tratamento expectante e sintomático.....	43
1.2.6.2- Tratamento cirúrgico.....;	43
1.2.6.3- Tratamento clínico complementar.....	45
1.2.6.4- Recorrências.....	46
1.2.7-p53.....	47
1.2.7.1- Proteína p53.....	47
1.2.7.2- Proteína p53. Função.....	49
1.2.7.3- Controle da expressão de p53.....	50
1.2.7.4- Perda da função da proteína p53.....	51
1.2.7.5- Heterozigozidade de p53.....	52
1.2.7.6- Polimorfismo de p53.....	53
1.2.7.7- A proteína p53 e a endometriose.....	53
2 – OBJETIVOS.....	55

2.1- OBJETIVO GERAL.....	55
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3- METODOLOGIA.....	56
3.1– Casuística.....	56
3.2- Análise molecular.....	58
3.3– Análise estatística.....	60
4– RESULTADOS.....	61
5– DISCUSSÃO.....	69
6- CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Cistos endometrióticos característicos presença de ecos de baixa amplitude e homogêneos. (Fonte: Abrão, 2000). Página 29

Figura 02: Doppler. Endometriomas com hipervascularização (setas) na periferia do nódulo - preenchendo os cistos pode ser observada (setas). (Fonte: Abrão 2000). Página 31

Figura 03: Ressonância Magnética – Endometrioma ovariano bilateral (setas). (Fonte: Abrão, 2000). Página 33

Figura 04: Lesões enrugadas pretas. Foram descritas uma figura difusa de fibrose como “clássico” e “típico”. (Fonte: Martin *et al.*, 2007). Página 35

Figura 05: Pequenos pólipos rosa e pontos brancos. As lesões avermelhadas apresentam 400 micras de diâmetro. (Fonte: Martin *et al.*, 2007). Página 36

Figura 06: Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

Página 36

Figura 07: Quando áreas cicatriciais brancas são associadas com pólipos vermelhos geralmente é endometriose. (Fonte: Martin *et al.*, 2007). Página 37

Figura 08: Pólipos claros e vesículas pode ser endometriose. Estas lesões são notadas lateralmente à tuba direita. (Fonte: Martin *et al.*, 2007). Página 37

Figura 09: Endometriose em fundo ligamento útero-sacro. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).
Página 38

Figura 10: Endometrioma ovariano. Sangramento “achocolatado”. (Fonte: Martin *et al.*, 2007). Página 39

Figura 11: Desenho esquemático da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53 (Fonte: Oliveira, 2005). Página 48

Figura 12: Foto do gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a cada primer utilizado na análise do polimorfismo do códon 72 do gene *p53*. Linha 1: heterozigoze PRO/PRO; linha 2: heterozigoze PRO/ARG; linha 3: homozigoze ARG/ARG. Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen). Página 59

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Seqüência dos *primers* analisados nas amostras de DNA em pacientes com endometriose, com ou sem infertilidade. Goiânia, 2008. Página 59.

Tabela II – Frequência dos alelos ARGININA E PROLINA e os grupos do estudo (pacientes com endometriose): I (inférteis) e II (férteis). Goiânia, 2008. Página 61.

Tabela III - POR QUEIXA –Diferença entre as queixas das pacientes com endometriose: (DOR/SANGRAMENTO, INFERTILIDADE + DOR/SANGRAMENTO ou INFERTILIDADE) com os alelos avaliados. Goiânia, 2008. Página 62.

Tabela IV - POR INTENSIDADE DE DOR PELVICA – Diferença entre a intensidade da dor pélvica (LEVE/MODERADA ou INTENSA) com algumas variáveis em pacientes com endometriose. Goiânia, 2008. Página 63.

Tabela V- POR CLASSIFICAÇÃO- Diferença entre a classificação das pacientes com endometriose (GRAU I/II) ou (GRAU III ou IV) com as variáveis pesquisadas. Goiânia, 2008. Página 65.

Tabela VI- POR TRATAMENTO CLÍNICO ASSOCIADO – Diferença entre a prescrição de tratamento clínico posterior à cirurgia e os alelos estudados em grupo de pacientes com endometriose com ou sem infertilidade. Goiânia, 2008. Página 66

Tabela VII – Correlação entre as variáveis estudadas e os grupos de pacientes com endometriose avaliadas: I (inférteis) e II (férteis). Goiânia, 2008. Página 67

Tabela VIII – Classificação laparoscópica da endometriose. Página 84.

Tabela IX. Descrição laparoscópica dos locais afetados pela endometriose . Página 85.

LISTA DE ABREVIACOES

a.C.- Antes de Cristo

ACHO- Anticoncepcional hormonal oral

AMP-D- Acetato de medroxiprogesterona de depósito

AT- Ataxia-telangiectsica

c-Abl- Recurrent splicing variant without

CCC- Citosina, citosina, citosina

CGC- Citosina, guanina, citosina

C-terminal- Carboxi-terminal

CYPs- Citocromo p450

d.C.- Depois de Cristo

17p- Braço curto do cromossomo 17

DNA- cido desoxirribonucléico

DNA-PK- Proteínas cinases ativadas por fita dupla de ácido desoxirribonucléico

EDTA- cido etilenodiamino tetra-acético

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofina

GSTM1- Glutathiona S-transferase M1

GSTs- Glutathiona S-transferase

GSTT1- Glutathiona S-transferase theta 1

HAT- Histona acetil-transferase

HC-FMUSP- Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de São Paulo

HDM2- Gene Humano double minute 2

Kb- Kilobase

LH- Hormônio Luteinizante

LUF- Síndrome da luteinização do folículo não-roto

MDM2- Gene Murino double minute

Mspl- Polimorfismo do gene receptor de estrogênio

N-terminal– Amino-terminal

P53- Proteína p53

p53- Gene p53

pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia de polimerase

%- Porcentagem

PRO/72 – Alelo prolina no códon 72

PROGINS- Gene dos receptores de progesterona

p13.2- braço curto região 1 banda 3, sub-banda 2

P21- proteína p21

RNAs- Ácidos ribonucleicos

SNPs- Polimorfismo de nucleotídeos únicos

(**T**→**C**) – Transição de uma Timina para uma citosina

Waf1- Inibidora de cinases dependentes de ciclinas

RESUMO

A endometriose é conceituada como a presença de tecido endometrial ectópico, com histologia e função semelhante ao endométrio normalmente situado. No entanto, a explicação para a implantação do tecido endometrial em determinadas mulheres ainda é desconhecida. O grau do comprometimento da endometriose baseia-se num sistema de pontos proposta pela American Fertility Society (1978), hoje denominada *American Society for Reproductive Medicine* com base nos achados de laparoscópica. A intenção deste estudo foi determinar a frequência do polimorfismo do p53, códon 72, em dois grupos de pacientes com endometriose e outros sintomas da doença. O estudo incluiu 38 amostras de sangue periférico de mulheres submetidas à videolaparoscopia com diagnóstico confirmado de endometriose. As pacientes foram divididas em dois grupos de 19 mulheres cada, um com infertilidade e o outro não. O polimorfismo foi avaliado por PCR. Os dados foram submetidos a análise estatística sendo usado o teste de qui-quadrado e Odds Ratio. Dos pacientes que só tiveram dor e/ou sangramento sem infertilidade, 09(47,3 %) eram arginina homozigoto e 10(52,6%) eram prolina homozigoto ou heterozigoto. Das pacientes que apresentaram infertilidade associado à dor e/ou sangramento 12(100%) era prolina homozigoto ou heterozigoto. Das pacientes que queixavam apenas de infertilidade, 05 (71,4%) eram arginina homozigoto e 02 (28,6%) prolina homozigoto ou heterozigoto. Correlacionando intensidade da dor, 04(23,5%) com alelo prolina (homozigoto ou heterozigoto) informaram dor leve e/ou moderada e 20(95,5%) dor intensas. Todas essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p=0,003$). Em intensidade da dor relacionado com a classificação laparoscópica foi encontrado o seguinte: 08(50%) pacientes que tiveram dor leve e/ou moderada tiveram classificação I ou II e 08(36,4%) foram incluídos na classificação III ou IV. Das pacientes com dor intensa, 08(36,4%) foram incluídas na classificação I ou II e 14 (63,6%) em III ou IV. Conclui-se que a presença do alelo prolina (homozigoto ou heterozigoto) está mais relacionado com pacientes com endometriose e com quadro clínico mais severo da doença.

Palavras chaves: p53, endometriose, polimorfismo do códon 72.

ABSTRACT

Endometriosis it is considered as the presence of ectopic endometrial tissue, with similar histology and function to the endometrium usually located. However, the explanation for the implantation of the endometrial tissue in certain women is still unknown. The determination of the degree of compromising of the endometriosis is based on a system of points proposed by American Fertility Society finds of the laparoscopy. Endometriosis is a disease that occurs mainly in women in reproductive age. The disease can be related with infertility in 30% to 40% of the cases. The possible mechanisms as the endometriosis as cause of the infertility are: (a) interference with the sexual function (dyspareunia, reduction of the frequency of sexual intercourse). (b) Interference with the ovulation: (anovulation; deficient luteal phase and luteinization phase. The aim of this study was to determine the frequency of p53 polymorphism codon 72, in two groups of patients with endometriosis and other symptoms of the disease. The study included 38 peripheral blood samples from women submitted to videolaparoscopy that confirmed endometriosis. The patients were divided into two groups of 19 women each, one with infertility and the other not. The polymorphism was evaluated by PCR. The data were submitted to statistical analysis using the chi-square and odds ratio tests. Of the patients who only had pain and/or bleeding without infertility, 09 (47.3%) were arginine homozygous and 10 (52.6%) were proline homozygote or heterozygote. Of those who presented with infertility associated with pain and/or bleeding, 12 (100%) were proline homozygous or heterozygous, and in those with only complaint of infertility, 05 (71.4%) were arginine homozygous and 02 (28.6%) proline homozygous or heterozygous). In correlating pain intensity, 04 (23.5%) women with the proline allele (homozygous or heterozygous) reported slight or moderate pain and 20 (95.5%) intense pain. All these differences were statistically significant ($p= 0.003$). In relating pain intensity to laparoscopic classification, the following was found: 08 (50%) patients who showed slight or moderate pain had a classification I or II and 08 (50%) III or IV. Of those with intense pelvic pain, 08 (36.4%) were included in classification I or II and 14 (63.6%) in III or IV. The proline allele (homozygous or heterozygous) is linked more to patients with infertility and with a more severe clinical picture.

Key words: p53, endometriosis, codon 72 polymorphism.

1- ENDOMETRIOSE

1.1- INTRODUÇÃO

1.1.1 – Definição

A endometriose é definida pelo aparecimento de focos ectópicos, extra-uterinos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticos aos da cavidade. É uma patologia de diagnóstico histológico, devendo o mesmo confirmar as suspeitas clínicas e os achados macroscópicos encontrados em cirurgias (Abrão, 2000).

Esta doença pode afetar vários órgãos (peritônio pélvico, trompas, ovários, tecido subcutâneo, mucosa nasal, trato urinário, pulmões, musculatura diafragmática, fígado, baço, intestinos, coração, etc.), sendo por isso mesmo denominada atualmente de multi-sistêmica (Ranney, 1980).

1.1.2 – Histórico

A primeira descrição dos sintomas característicos da endometriose bem como o tratamento para as alterações menstruais provocados pela doença teria ocorrido em 1600 a.C. através do Papiro Egípcio de Ebers (Nakata *et al.*, 2004) e 1835 d.C. Cruveilhier faz referência a lesões císticas de anexos, útero e vagina (Baranova *et al.*, 1987).

Em 1860 d.C. Carl Von Rokitansky, na Alemanha, segundo a maioria dos estudos, fez a primeira descrição patológica de um caso de endometriose quando deparou com a presença de tecido semelhante ao endométrio, ectópico, em peças de necropsia (Giordano, 1998).

Sampson em 1927 após outros estudos sobre a doença descreveu a endometriose da forma como é conhecida atualmente e sugeriu a menstruação retrógrada como provável

etiologia após observar sangue saindo pelas tubas uterinas e no lúmen das trompas de mulheres operadas durante a menstruação.

Essa teoria ainda é bastante utilizada para explicar a origem da doença. Ela propõe que as células endometriais viáveis, uma vez descamadas após a menstruação, alcançariam por refluxo, via tubas uterinas, a cavidade peritoneal, com conseqüente implantação e crescimento local, uma vez que macrófagos peritoneais de pacientes com endometriose não apresentam capacidade de digerir eficientemente o refluxo menstrual (Chaco *et al.*, 1987).

Mas na realidade é uma doença que gera muitas incertezas quanto a sua etiologia, na medida em que existem diferentes teorias, embora nenhuma delas permita explicar todos os casos e todas as localizações. O encontro de focos ectópicos seria conseqüência de múltiplos fatores causais (Halme, 1984).

1.2- REVISÃO LITERÁRIA

1.2.1 – Epidemiologia

É uma síndrome ginecológica relativamente comum na população geral, podendo afetar 18% das mulheres em idade reprodutiva, produzindo, em muitas destas, sintomas debilitantes como dismenorréia, dor pélvica crônica, dispareunia e redução da fertilidade (Strathy *et al.*, 1982). Entretanto, quando considerado somente as pacientes com dor pélvica e com infertilidade, a incidência de endometriose sobe para 87% (Ozawa *et al.*, 1982).

Um estudo importante sobre a epidemiologia da endometriose foi realizado por Mathias *et al* (1996), em que enviaram 5263 questionários para mulheres com idade entre 18 e 50 anos e foram obtidos os seguintes resultados: 14,7% das entrevistadas eram portadoras de dor pélvica crônica e destas, 61% não tinha causa definida e 45% informaram diminuição da capacidade de trabalho em função da dor.

Outro estudo que complementa os resultados obtidos no primeiro é o realizado por Velebil *et al.* (1995) que relata que a endometriose é a terceira principal causa de internação relacionada a distúrbios do aparelho reprodutor em mulheres entre 15 e 44 anos.

1.2.1.1 - Idade

A doença está relacionada ao período reprodutivo da mulher, uma vez que o estrogênio se faz necessário para o desenvolvimento da doença. Em casos raros a doença pode ser identificada em mulheres fora deste período. Moen *et al.* (1997) estimaram que 2% das mulheres entre 40 e 42 anos apresentavam esta patologia.

Já Reese *et al.* (1996) fizeram um acompanhamento 67 pacientes entre 11 e 19 anos com dor pélvica crônica, sem melhora com tratamento clínico e que foram submetidas à laparoscopia. Neste estudo, foram encontrados 73% de achados compatíveis com endometriose, sendo em sua maioria no estágio I segundo a classificação da *American Society of Reproductive Medicine* revisada em 1986. Vale ressaltar que não existem dados que indiquem relação entre idade da paciente e gravidade da doença. Segundo um estudo realizado no ambulatório de ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período compreendido entre 1992 a 1999, foram avaliadas 244 pacientes entre 17 e 60 anos com diagnóstico definitivo de endometriose e a idade que mais se repetiu entre as pacientes foi de 32 anos (Abrão, 2000).

Segundo Hadfield *et al.* (1996), o tempo médio entre o início dos sintomas e o aparecimento da doença é de 11,7 anos nos Estados Unidos e 7,9 anos no Reino Unido.

1.2.1.2 - Antecedentes obstétricos e ginecológicos

Em relação aos antecedentes obstétricos é observado que a proteção progesterônica fisiológica que ocorre durante a gestação faz com que a incidência da doença seja maior

em pacientes nuligestas. Pacientes múltiparas apresentam menor incidência, permanecendo em níveis de 3% a 4% segundo trabalho realizado por Sangi-Hagypeykar e Poindexter em 1995, que ao realizar laqueadura tubária laparoscópica em 3.384 mulheres múltiparas, encontraram somente 126 (3,7%) casos de endometriose.

Na avaliação da infertilidade, estima-se que em 30% a 50% das situações exista correlação entre esterilidade e endometriose, porém sem uma explicação bem estabelecida. São necessárias, quando se avalia esta relação, as mulheres assintomáticas, serem usuárias de contraceptivos ou mesmo não possuir vida sexual. Um trabalho realizado por Dmowski *et al.* (1997) dividiu pacientes em dois grupos: 357 pacientes com dor pélvica e endometriose e 336 pacientes com infertilidade e endometriose e concluíram que existem diferenças demográficas e epidemiológicas nestes dois grupos na medida em que o primeiro se compõe de pacientes mais jovens, com menor grau de instrução, com história familiar da doença, mais sintomáticas e maior tempo entre o início dos sintomas e a época do diagnóstico, refletindo a provável progressão da doença (Abrão, 2000).

Em razão da maior exposição da paciente ao estrogênio, é comum encontrar maior quantidade de casos de endometriose entre as mulheres que tiveram puberdade precoce (desenvolvimento de caracteres sexuais secundários entre 8,5 e 13 anos), entre as nulíparas e entre aquelas com menopausa tardia (após 55 anos). Nos estudos de Parazzini *et al.* (1989), foram relatados o efeito protetor encontrado nas pacientes com menarca acima dos 15 anos. No trabalho de Matorras *et al.* (1995), as pacientes estudadas que apresentavam endometriose tendiam a apresentar ciclos menstruais com intervalos maiores (acima de 35 dias) e com maior duração (acima de 6 dias).

1.2.1.3 - Fumo

Mulheres tabagistas com consumo acima de 20 cigarros por dia apresentam níveis de

estrogênio circulante menor e, por conseqüência, uma menor incidência de endometriose. Este resultado, porém, não foi encontrado em todos os estudos, havendo diferenças entre os trabalhos. Por exemplo, segundo Cramer *et al.* (1986), mulheres tabagistas que haviam iniciado o hábito antes dos 17 anos e que fumavam pelo menos 20 cigarros ao dia possuíam uma menor incidência de desenvolver endometriose quando comparadas a mulheres sem esse perfil de hábito. Já no trabalho de Parazzini *et al.* (1989), essa diferença não foi encontrada.

1.2.1.4 - Atividade física

A atividade física teria um efeito protetor dependendo da época de início e da freqüência por reduzir os níveis de estrogênio circulante nas praticantes. Teria também um benefício adicional, na medida em que melhora a imunidade das pacientes que a praticam de forma regular (Cramer *et al.*, 1986).

1.2.1.5 - Antecedentes familiares

A história familiar da endometriose apesar dos resultados conflitantes pode ser explicada por fatores genéticos e também pela exposição das mulheres a estilos de vida semelhantes (Velebil *et al.*, 1995). Um estudo que confirma a positividade da história familiar na gênese da endometriose foi realizado por Moen e Magnus (1995), em que foram entrevistadas 515 pacientes com endometriose confirmada por cirurgia e 149 pacientes, com pelve normal documentadas, através de cirurgia de esterilização tubária laparoscópica. Os autores encontraram uma tendência estatisticamente confirmada de maior freqüência de manifestações sugestivas de endometriose naquelas pacientes com história familiar. Este estudo relatou ainda a existência de oito gêmeas monozigóticas, das quais, seis (75%) tiveram endometriose documentada cirurgicamente.

A epidemiologia da endometriose é cheia de dados conflitantes, mas de uma forma geral, é possível que o estresse da vida moderna com a conseqüente repercussão no sistema imunológico, a precocidade da menarca, a redução da paridade e a postergação da primeira gestação estejam envolvidas no surgimento da doença. De todo modo, fica implícito a necessidade de mais estudos epidemiológicos que possam elucidar essas dúvidas, dentre as muitas que pairam sobre a endometriose, desde sua fisiopatologia até seu tratamento (Abrão, 2000).

1.2.2 – Etiopatogenia

Com relação a todas as teorias propostas para o surgimento da endometriose podemos agrupá-las em seis etiologias:

1.2.2.1 - Origem Mülleriana

Transformação de restos embrionários em que a endometriose se originaria da transformação dos restos do sistema de Wolff e Müller, baseando-se em estudos histológicos e localização das lesões em regiões anatomicamente próximas aos ductos de Wolff ou de Müller (Russel, 1899).

1.2.2.2 - Metaplasia celômica

O epitélio celômico se transformaria em glândulas e estromas endometriais (Meyer, 1919). Baseia-se no fato de serem órgãos genitais, entre eles o endométrio e o peritônio, oriundo embriologicamente do endotélio celômico, tendo estes a capacidade de se diferenciarem de elementos müllerianos como o endométrio, a partir de estímulos hormonais exagerados. Acredita-se que essa seja uma provável causa da endometriose do septo retovaginal (Donnez, 1989).

1.2.2.3 - Menstruação retrógrada

É uma das teorias mais citadas e aceitas para explicar a origem da endometriose, propondo que implantes ectópicos são desenvolvidos a partir de um fragmento de endométrio que, em função do fluxo menstrual retrógrado extravasam através das tubas uterinas para a cavidade peritoneal e ali se aderem (Sampson, 1921). Apesar de que em cirurgias laparoscópicas é comum o encontro de sangue na cavidade peritoneal, essa teoria não explica o porquê nem todas as mulheres que apresentam a menstruação retrógrada desenvolvem endometriose e nem a presença de focos da doença em regiões localizadas fora da cavidade pélvica (Braun *et al.*, 1992).

1.2.2.4 - Disseminação linfática

A partir do encontro de tecido endometrial na parede de vasos linfáticos e em linfonodos da região pélvica foi postulado essa teoria para explicar o encontro de focos de endometriose em locais como a parede pélvica e a região inguinal. Teoria descrita por Halban *et al.* (1925) .

1.2.2.5 - Disseminação hematogênica

De modo semelhante à teoria da disseminação linfática, o encontro de focos de tecido endometrial viável na parede de vasos sanguíneos, bem como o fato de que os vasos no período menstrual são mais permeáveis, essa teoria tenta postular o encontro da endometriose em locais distantes, como pulmão, vulva, pulmão e baço. Teoria descrita por Sampson (1927).

1.2.2.6 – Teoria iatrogênica

É uma teoria não aceita universalmente, em que se encontram focos de endometriose

em cicatrizes de cesariana e episiotomias, talvez justificada pelo uso de material “contaminado” por tecido endometrial. Teoria descrita por Greenhill (1942).

1.2.2.7 – Teoria composta

Essa teoria se baseia no reconhecimento de que nenhuma das explicações encontradas para o surgimento da doença é suficiente para explicar os diversos locais em que a mesma pode ser encontrada. Dessa forma, a endometriose não seria explicada por apenas uma teoria, mas pelo conjunto de todas. Teoria descrita por Javert (1949).

1.2.2.8 - Fatores endócrinos e parácrinos

Baseia-se no fato de que endometriose seja uma doença dependente de estrogênio. Essa teoria tenta explicar por que fatores como a primeira gestação tardia, menarca precoce, baixa paridade estariam relacionadas a uma maior incidência da doença (Metzger e Haney, 1989).

1.2.2.9 - Alterações no sistema imunológico

Existem evidências que sugerem que a endometriose esteja intimamente associada a alterações do sistema imunológico. A elevação das células B e a diminuição das células T reativas em pacientes com endometriose sugerem a possibilidade de uma reação antígeno-anticorpo anormais nestas pacientes.

Alterações na imunidade humoral e celular interfeririam no processo de fertilização e implantação. Em mulheres com endometriose, o percentual de linfócitos no sangue periférico é normal, mas sua produção de interleucina-I está aumentada. No entanto, é encontrado um aumento de macrófagos peritoneais em número, concentração e atividade funcional, implicando em um aumento da secreção de citocinas, prostaglandinas,

capacidade fagocitária, enzimas, fatores de crescimento, entre outros. Isto é demonstrado pelo aumento nos níveis de emissão de quimiluminescência (uma técnica laboratorial para detectar a presença destas substâncias em nível celular). A presença de um maior número de macrófagos peritoneais – monócitos intravasculares que migram para a cavidade peritoneal – principalmente os ativados maduros e grandes, com maior capacidade fagocitária, pode interferir no processo reprodutivo de várias maneiras: pela fagocitose de espermatozoides; diminuição da sua mobilidade; impedimento da capacitação de oócitos e pela diminuição da sobrevivência dos embriões. Também se encontram uma maior citotoxicidade dos linfócitos periféricos e macrófagos peritoneais em pacientes inférteis comparada com pacientes férteis. Curiosamente esta citotoxicidade encontra-se diminuída em pacientes com endometriose severa quando comparada à leve (Abreu, 2005).

1.2.2.10 - Fatores genéticos

Múltiplos estudos têm demonstrado uma tendência familiar ou racial na ocorrência da endometriose (Velebil *et al.*, 1995).

O estresse oxidativo tem sido apontado como fator potencial envolvido na fisiopatologia de endometriose. A produção de espécies reativas de oxigênio pelo fluido peritoneal parece estar aumentada em mulheres com a doença e a expressão alterada de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo também já foi observada no endométrio de mulheres com esta condição. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pode também ser resultado da exposição a compostos ambientais que rompem o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (Nakata *et al.*, 2004).

É possível que polimorfismos genéticos em enzimas envolvidas na produção e

eliminação de espécies reativas de oxigênio, bem como naquelas que participam da ativação e detoxificação de compostos exógenos (xenobióticos), modulem os níveis de biomarcadores de dano oxidativo (Hong *et al.*, 2002).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado, ou de fase I, e as enzimas conjugadas, ou de fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). Em contraposição, as reações de fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno, por meio da glutathione S-transferase (GSTs), UDP-glucuroniltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos de fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (Rossit *et al.*, 2000).

Dentre as enzimas GSTs mais conhecidas estão as GSTT1 e GSTM1. O gene GSTM1 é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais ativos que apresentam a mesma eficiência metabólica e um alelo com atividade nula. Este último não sintetiza seu produto protéico devido a grande deleção no gene. Homozigotos para o alelo GSTM1 nulo são considerados grupo de risco, principalmente se expostos a elevados níveis de carcinógenos e compostos químicos, devido ao defeito enzimático em seu sistema de detoxificação (Baranova *et al.*, 1987). Assim como o gene GSTM1, o GSTT1 também é polimórfico na população humana, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção.

Em relação às CYPs, uma das mais extensivamente estudada é a CYP1A1. Um polimorfismo de restrição MspI, com transição de uma timina para citosina (T→C), parece promover aumento de sua expressão (Arvanitis *et al.*, 2001). Desse modo, diferenças genéticas na regulação, expressão e atividade dos genes de fases I e II pode ser o fator crucial na susceptibilidade a certos tipos de doenças (Rossit *et al.*, 2000). Realmente,

polimorfismos em genes do biometabolismo têm sido identificados em inúmeras populações e relacionados com neoplasias de pulmão, fibrose cística, bronquite crônica e endometriose (Linhares *et al.*, 2005).

Alguns autores já demonstraram que os receptores de estrogênio estão presentes de forma exagerada em implantes de endometriose. Também foram descritos defeitos nos receptores de progesterona (Bergqvist *et al.*, 1995; Nisole *et al.*, 1997). E a anormalidade do efeito gestacional no endométrio tópico e no ectópico estaria relacionada com as alterações promovidas pela doença. A maior secreção de colagenases, bem como a menor expressão de seus fatores inibidores, a secreção de peptídeos angiogênicos, o controle do ciclo celular e a metabolização dos estrogênios nas células endometriais são, como se sabe, regulados pela progesterona. Alterações de sua função podem, portanto, facilitar o surgimento da doença porque num sentido amplo, deixam de antagonizar os efeitos proliferativos dos estrogênios (Nakata *et al.*, 2004). As ações biológicas da progesterona são mediadas por duas isoformas de seu receptor, respectivamente A e B. Em seres humanos os dois RNAs transcritos são gerados a partir de um único gene, no entanto, em regiões promotoras diferentes. Estruturalmente as proteínas diferem apenas quanto à presença de 164 aminoácidos na região N-terminal do receptor B (Carvalho *et al.*, 2004).

No endométrio os dois tipos de receptor de progesterona são expressos e sua concentração varia de acordo com a fase do ciclo menstrual. Entretanto parece que os efeitos anti-proliferativos da progesterona sobre o endométrio são mediados principalmente pela isoforma A. A ativação da isoforma B, na ausência de receptor tipo A leva à proliferação do epitélio. Portanto, havendo a predominância da isoforma B (Mulac-Jerevic *et al.*, 2000), não há adequada ação da progesterona, levando-se a crer, desse modo, que talvez esta alteração esteja relacionada com a gênese da endometriose (Nakata *et al.*, 2004).

Recentemente, vários polimorfismos do receptor de progesterona têm sido descritos. Dentre eles destaca-se o polimorfismo *PROGINS* que consiste em uma inserção de Alu de 306 pb no íntron G entre o exon 7 e 8 do gene do receptor de progesterona humano (Donaldson *et al.*, 2002). Rowe *et al.* (1995) observaram alterações fenotípicas decorrentes dos polimorfismos do gene desse receptor, tanto por recombinação ou por alteração no splicing do transcrito primário. O polimorfismo *PROGINS* tem sido estudado em associação com doenças que tenham relação com níveis de estrogênio (estrogênio-dependentes) (Kurz *et al.*, 2001; De Vivo *et al.*, 2003). Wieser *et al.* (2002) estudaram a frequência dessa mutação em mulheres com endometriose; encontraram-na em 28% dos casos e em apenas 14% das sadias. Todos os dados indicam que uma mutação no gene do receptor da progesterona, seja qualquer uma das mencionadas acima, contribui para o surgimento de doenças em tecidos hormônios dependente, inclusive na endometriose (Giordano, 1988).

A endometriose é uma doença de origem multifatorial com componente poligênico presente. Existe um risco definido de que possa ocorrer degeneração maligna e em razão disso, têm sido estudadas possíveis relações entre variações genéticas de p53, em particular do códon 72. Neste códon, a substituição de um nucleotídeo resulta na presença de arginina (Arg) ou prolina (Pro) na seqüência do aminoácido. A mudança de aminoácido afeta propriedades bioquímicas e funcionais de p53. A variante prolina é um ativador transcricional mais forte, enquanto a variante arginina é um maior indutor de apoptose (Ammendola *et al.*, 2008).

1.2.3 - Endometriose – Diagnóstico

1.2.3.1 - Diagnóstico clínico

O diagnóstico da endometriose não é tão simples, já que muitas vezes é assintomática e outras vezes se manifesta através de sintomas inespecíficos que não orientam quanto a sua presença e desse modo dificultando o diagnóstico precoce e oportuno e por consequência, a terapêutica de forma rápida (McLaren, 1996). Suspeita-se de endometriose naquelas pacientes com queixa de infertilidade, dor pélvica cíclica, especialmente exacerbada durante a menstruação (dismenorréia) e a dispareunia profunda.

A endometriose é uma doença de manifestações clínicas variadas. Algumas manifestações são mais frequentemente descritas (Giordano, 1998).

Dismenorréia – descrita como sintoma clássico da endometriose, é secundária e progressiva (se agrava progressivamente) (Giordano, 1998).

Dispareunia – sintoma bastante comum, ocorrendo principalmente quando há comprometimento do fundo-de-saco de Douglas e do septo retovaginal e quando existe uma retroversão fixa, do útero, associada (Giordano, 1998).

Dor à defecação – ocorre quando a endometriose se localiza no reto ou em suas proximidades, sendo mais intensa durante a menstruação (Giordano, 1998).

Formação tumoral – pode ser a queixa principal da paciente, principalmente no caso de uma lesão da parede abdominal ou do períneo (Giordano, 1998).

Dor abdominal – a endometriose geralmente forma aderências entre órgãos pélvicos, produzindo dor crônica no abdome inferior e na pelve, às vezes referida às virilhas, quadris e coxas (Giordano, 1998).

Distúrbios menstruais – observam menorragia, hipermenorragia em pacientes com endometriose pélvica, geralmente significando função ovariana alterada devido a comprometimento ovariano bilateral (Giordano, 1998).

Queixas urinárias – Cerca de 1 a 11% das pacientes com endometriose podem apresentar envolvimento ureteral e da bexiga. Em um estudo realizado na Clínica

Ginecológica do HC-FMUSP com 244 casos foi observado os seguintes sintomas em pacientes com endometriose: disúria, polaciúria, infecções urinárias de repetição, hematúria e urgência miccional (Abrão, 2000).

Infertilidade – Alguns estudos clássicos relatam que 6% a 58% das pacientes com infertilidade apresentam endometriose e que 30% a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (Giordano, 1998).

A endometriose só pode ser confirmada por meio de observação direta através da laparoscopia ou de uma laparotomia, associada à biópsia das áreas de endométrio ectópico (Giordano, 1998).

1.2.3.2 – Diagnóstico laboratorial

Além da clínica, do exame físico minucioso (podendo incluir toque vaginal e/ou retal), o uso de marcadores séricos tem importante papel preditivo da doença e é de valor no seu manejo clínico. O Ca-125 (*Antígeno associado ao câncer 125*) O glicoproteína, normalmente produzida pelo epitélio das serosas, trompas de falópio, endométrio e endocérvix. Não é encontrado no ovário normal; entretanto níveis elevados são encontrados no câncer de ovário, sendo usado como marcador tumoral. Sua dosagem também pode ser detectada em outras condições: endometriose, gestação, pacientes saudáveis, câncer de CA-125 é uma endométrio, e outras neoplasias (Abrão *et al.*, 1997).

O CA-125 circulante originário do epitélio celômico pode estar aumentado no sangue periférico. O CA-125 é citado como único marcador tumoral de importância no diagnóstico de endometriose nos estágios III e IV, especialmente quando as amostras de sangue foram coletadas durante os três primeiros dias da menstruação. O grau de elevação do CA 125 varia com a severidade da doença, sendo positiva em 8%, dos estágios I, e

88,6% dos estágios IV. O nível no líquido peritoneal é descrito como um indicador mais sensível que o nível sérico, tendo valores superiores nos estágios iniciais. Os níveis séricos correlacionam com a evolução e caem com o tratamento clínico e cirúrgico. É comum encontrar valores de CA 125 acima de 100 U/ml na endometriose (Abrão *et al.*, 1997).

As indicações diagnósticas e terapêuticas em pacientes com endometriose pélvica podem ser corroboradas pela determinação do Ca-125 II, preditivo dos estágios III e IV da doença e dos anticorpos anticardiolipinas IgM (aCL) para caracterizar endometriose inicial. Um valor do Ca-125 II > 33 UI/ml é preditivo de endometriose em mais de 70% dos casos e acima de 100 UI/ml é preditivo em 100% dos casos. A determinação combinada de aCL (IgM) > 10MPL e proteína-C reativa (PCR) > 3 microgramas/ml é preditivo de endometriose em 98% dos casos. Quando alterados de forma isolada, tem valor preditivo de 73% e 78%, respectivamente. A determinação deve ser feita entre os dias 1 a 3 do ciclo (Abrão *et al.*, 1997).

A Alfa 2 – PEG (PP14) e outros marcadores endometriais aparecem no fluido peritoneal na fase lútea. Ocorrem à formação de anticorpos contra histonas, citoplasma glandular da camada funcional do endométrio e outros antígenos (Braun *et al.*, 1992).

1.2.3.3 - Diagnóstico por imagem

A – Ecografia

A ecografia tem sido de muita utilidade no diagnóstico e seguimento de pacientes com endometriose. E isso se deve, sobretudo, após o advento da ecografia transvaginal que após o aparecimento de transdutores de alta resolução têm se constituído num método complementar de baixo custo e por isso mesmo acessível a grande parte da população.

Os transdutores transvaginais podem ser aproximados as estruturas pélvicas e com isso permite o uso de frequências mais elevadas garantindo melhor qualidade na avaliação da textura dos tecidos, bem como da densidade do conteúdo dos cistos (Fleischer *et al.*, 1996).

Os ovários se constituem em importante sítio de localização para implantes endometriais, juntamente com o folheto posterior do ligamento largo (Kurjak e Kupesic, 1994). Com relação às alterações causadas pela endometriose nos ovários os cistos endometrióides são os mais encontrados (Figura 1). Isso porque nas formas iniciais da doença com comprometimento mínimo ou leve a ecografia pouco acrescenta. Estes cistos endometrióides não representam um cisto verdadeiramente do ovário, mas sim um pseudocisto que repousa sobre o córtex ovariano e que, após um pequeno foco de hemorragia superficial na região da fosseta ovariana, uma aderência débil do ovário ao peritônio é formada seqüestrando uma quantidade variável de tecido endometrial.

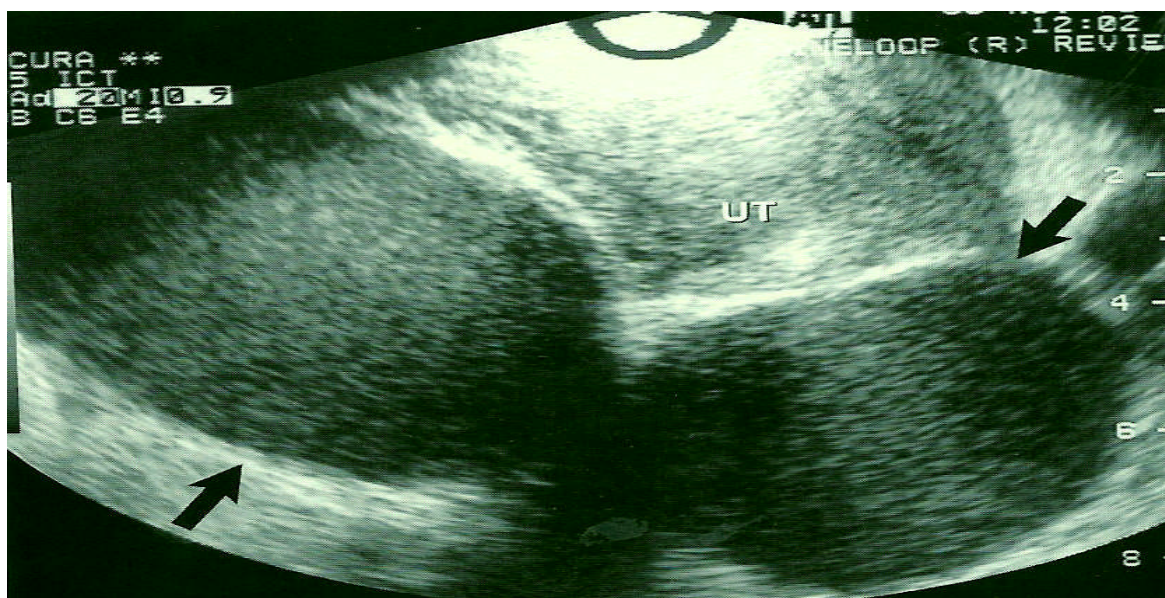


Figura 01: Cistos endometrióticos característicos presença de ecos de baixa amplitude e homogêneos. (Fonte: Abrão, 2000).

Posteriormente ocorre uma grande inversão da superfície cortical ovariana formando-se um pseudocisto, que em uma fase final sofre apenas de distensão. Os cistos

endometrióticos de grandes proporções podem também ser resultado de um envolvimento secundário de cistos ovarianos funcionais pelo processo de endometriose (Abrão, 2000).

É importante que o médico ecografista atente para o diagnóstico diferencial entre os cistos endometrióticos e outros cistos, uma vez que o tratamento do primeiro se dá por cirurgia. A ecografia apresenta uma alta sensibilidade e especificidade (83% e 89%, respectivamente). E essa especificidade se compara ao da ressonância magnética (Abrão, 2000).

A descrição característica do aspecto ecográfico dos cistos endometrióticos seria, na maioria das vezes dada como imagem hipocóica, homogênea, de contornos regulares e limites precisos, com ecos de baixa ecogenicidade (Kupfer *et al.* 1992).

As alterações que com mais frequência fazem diagnóstico diferencial com cistos endometrióticos seriam: corpo lúteo hemorrágico, cistos dermóides, cistoadenomas e cistoadenocarcinomas de ovário (Abrão, 2000).

A endometriose localizada em tecidos extra-ovarianos apresenta limitações, porém, com a melhoria dos equipamentos é possível em alguns casos localizar a presença de nodulações em parede abdominal, reto, sigmóide, bexiga, vagina e colo uterino. É possível ainda se observar alterações que possam ser consequência da doença, tais como dilatação da tuba uterina motivada por obstrução ou aderências e a presença de líquido em cavidade pélvica (Abrão, 2000),

É possível se fazer segmento ecográfico de pacientes portadoras de endometriose onde se busca observar:

- Dimensões dos endometriomas, indicando a progressão ou regressão da doença.
- Modificações ecotexturais dos cistos.
- Ocorrência de material sólido ecogênico no interior do cisto podendo indicar novos sangramentos.

- Progressiva liquefação deste material pela observação de perda de sua ecogenicidade, por vezes formando imagens “rendilhadas”.
- Alguns cistos podem se tornar completamente anecóicos durante sua evolução.
- Em alguns casos pode se verificar a presença de nível líquido/líquido pela deposição do sedimento em planos mais inferiores.

Na terapêutica de cistos endometrióticos recorrentes ou quando o tratamento cirúrgico não é desejado, a aspiração orientada pela ecografia representa uma alternativa terapêutica. A técnica é simples, realizada com a paciente sob leve sedação. Seu conteúdo espesso pode causar dificuldade na aspiração, porém com irrigação de solução salina e aspiração intermitente pode-se conseguir esvaziá-lo. Apesar das taxas de recidiva em torno de 53%, a aspiração constitui alternativa terapêutica quando a cirurgia é indesejada ou contra-indicada (Abrão, 2000),

O uso do doppler colorido e pulsado no estudo da endometriose é relativamente recente e ainda estão sendo realizados estudos com a intenção de caracterizar a importância desse método no estudo da endometriose (Figura 2).

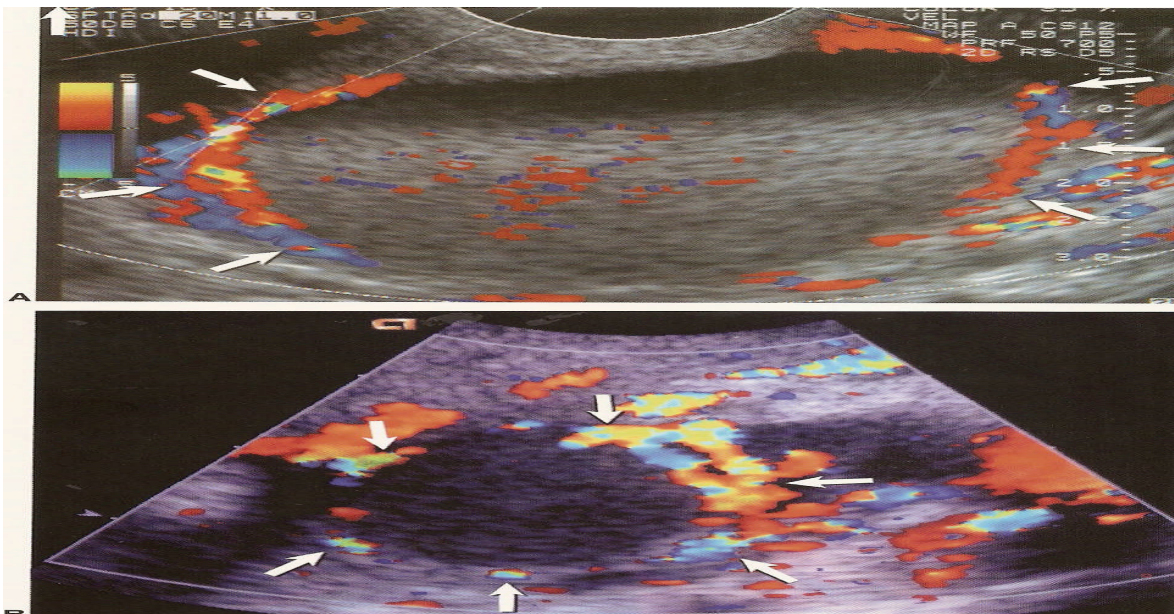


Figura 02: Doppler. Endometriomas com hipervascularização (setas) na periferia do nódulo - preenchendo os cistos pode ser observada (setas). (Fonte: Abrão 2000).

O doppler é um método complementar a ecografia em escalas de cinzas, e visa detectar e analisar o fluxo de sangue em determinado vaso . Utiliza um feixe de ultra-som auxiliar, que ao incidir sobre as partículas em movimento (hemácias), retorna ao aparelho com certa variação de frequência (efeito doppler). O aparelho de ultra-som pode medir esta variação de frequência e transformas estes dados em curvas espectrais, onde são avaliados parâmetros como velocidade do fluxo sanguíneo e índices matemáticos semi-quantitativos que analisam a resistência do leito vascular ao fluxo: são os índices de resistência, de pulsatilidade e a relação sístole/diástole. Quanto maior o fluxo diastólico final no ciclo cardíaco, menor a resistência de um leito vascular. Além da análise destes aspectos, uma camada colorida pode ser sobreposta à camada das imagens em escala de cinza, detectando através de sinais coloridos (pelo efeito doppler) um mapa vascular da região analisada (Abrão, 2000).

É o doppler colorido, que permite um exame mais rápido e mais seguro por possibilitar a detecção de vasos de maneira mais clara. Pode-se ainda utilizar o mapa colorido para se avaliar (com componente subjetivo) o grau de vascularização de um órgão através da quantidade de sinais coloridos nele detectados (Abrão, 2000),

Com relação à endometriose, ainda são poucos os trabalhos que determinam a sensibilidade e especificidade de tal técnica. Kurjak e Kupesic em 1994 relataram que a ultra-sonografia transvaginal com doppler colorido pulsátil seria uma técnica útil no diagnóstico de endometrioma, descrevendo que tais cistos ovarianos apresentam uma vascularização típica no nível do hilo ovariano, com vasos separados regularmente (Abrão, 2000),

B – Ressonância Magnética

O diagnóstico por meio da ressonância magnética (Figura 3) é descrito como uma forma capaz de determinar com exatidão a extensão da endometriose, podendo sugerir se a manifestação é inicial ou se encontra em estágio avançado. Apesar de alguns pesquisadores se manifestarem pouco entusiasmados com a técnica (Arrive *et al.*, 1989 e Zawin *et al.*,1989), a ressonância tem se mostrado útil, podendo mostrar com mais precisão a extensão e a profundidade das lesões endometrióticas (Abrão, 2000).

A ressonância magnética é uma técnica complementar não invasiva que poderá ser útil como complemento à laparoscopia, podendo ter um valor importante nos casos em que o acesso laparoscópico pode ser dificultado por aderências, bem como na avaliação de sítios extra-peritoneais. Importante também por precisar os sítios de implantação. O alto custo do exame restringe a sua utilização (Giordano, 1998).

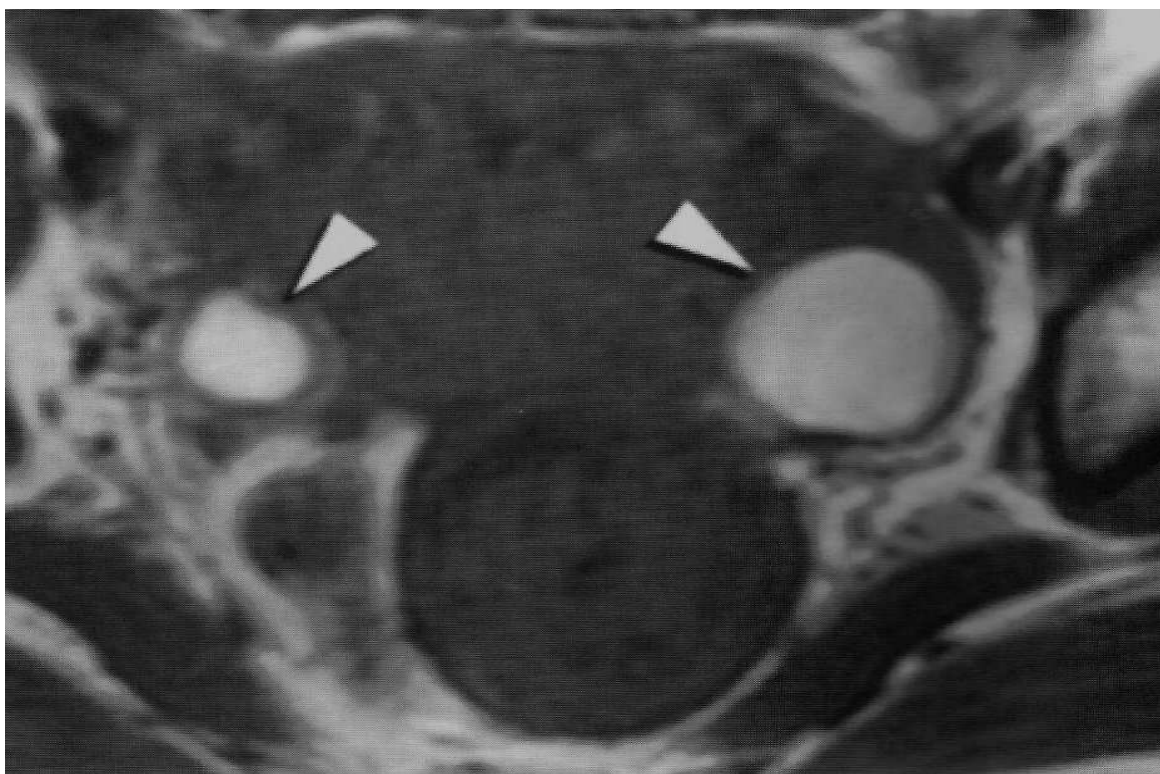


Figura 03: Ressonância Magnética – Endometrioma ovariano bilateral (setas). (Fonte: Abrão, 2000).

C – Tomografia computadorizada

Raramente utilizada no diagnóstico de endometriose em razão de seu alto custo e exposição prolongada à irradiação. Os aspectos observados são muito variados e as lesões não apresentam campo padrão de densidade (Hegg *et al.*, 1993).

D – Cistoscopia e retossigmoidoscopia

Podem levar ao diagnóstico indireto de lesões de endometriose, pois ocorrem compressões e aderências extrínsecas nos desvios por endometriomas. Em alguns casos de endometriose vesical podem-se visualizar lesões azuladas através da cistoscopia (Giordano, 1998).

E – Colposcopia

Auxilia o diagnóstico nos casos de endometriose cervical ou vaginal (Giordano, 1998).

F – Laparoscopia

É sem dúvida o exame mais utilizado na confirmação diagnóstica da endometriose. Uma grande vantagem do método é que além de se mostrar com alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença, permite que se retire material para estudo anatomopatológico e também que se realize o tratamento durante o ato.

A caracterização do aspecto da endometriose durante a realização da laparoscopia é relativamente fácil para o cirurgião experiente. Obviamente a confirmação se dará por análise microscópica do tecido retirado. A exploração cirúrgica da cavidade inclui a avaliação das alças intestinais, a bexiga, os órgãos genitais internos e seus ligamentos, e a escavação reto-uterina. O diagnóstico da endometriose profunda é realizado pela “palpação” da lesão endometriótica sob o peritônio normal (Donadio e Neto, 2001).

O aspecto encontrado na avaliação laparoscópica da endometriose peritoneal se dá pelo encontro de lesões com aspectos sugestivos. Existe a lesão considerada típica de endometriose composta de glândulas, estromas e debris endometriais. Na laparoscopia se observa uma lesão negra, azulada ou arroxeadada, pregueada, associada a uma cicatrização em forma de estrela decorrente de sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos (Figura 4) (Nissole *et al.*, 1994).

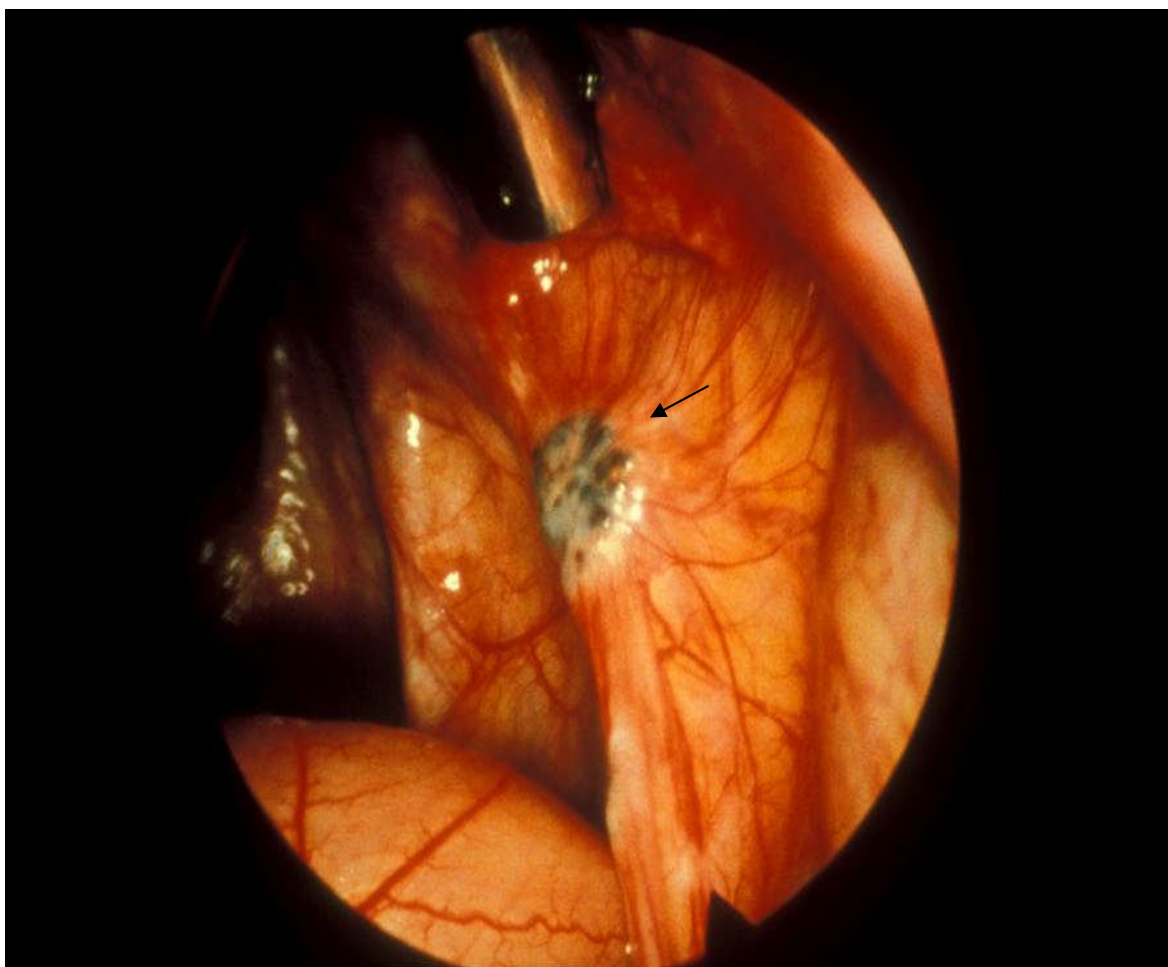


Figura 04: Lesões enrugadas pretas. Foram descritas uma figura difusa de fibrose como “clássico” e “típico”. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

Outras lesões também encontradas frequentemente encontradas no peritônio e provavelmente mais relacionadas com a atividade da doença (Donnez *et al.*, 1993), são as chamadas lesões vermelhas (em chama de vela, excrescências glandulares, lesões petequiais e áreas de hipervascularização) (Figuras 05 e 06) e as lesões brancas (Figuras

07 e 08) (opacificações brancas, aderências subovarianas, lesões tipo “café-com-leite” e defeitos do peritônio (Nisolle *et al.*, 1990) (Stripling, 1988)) (Figura 09).

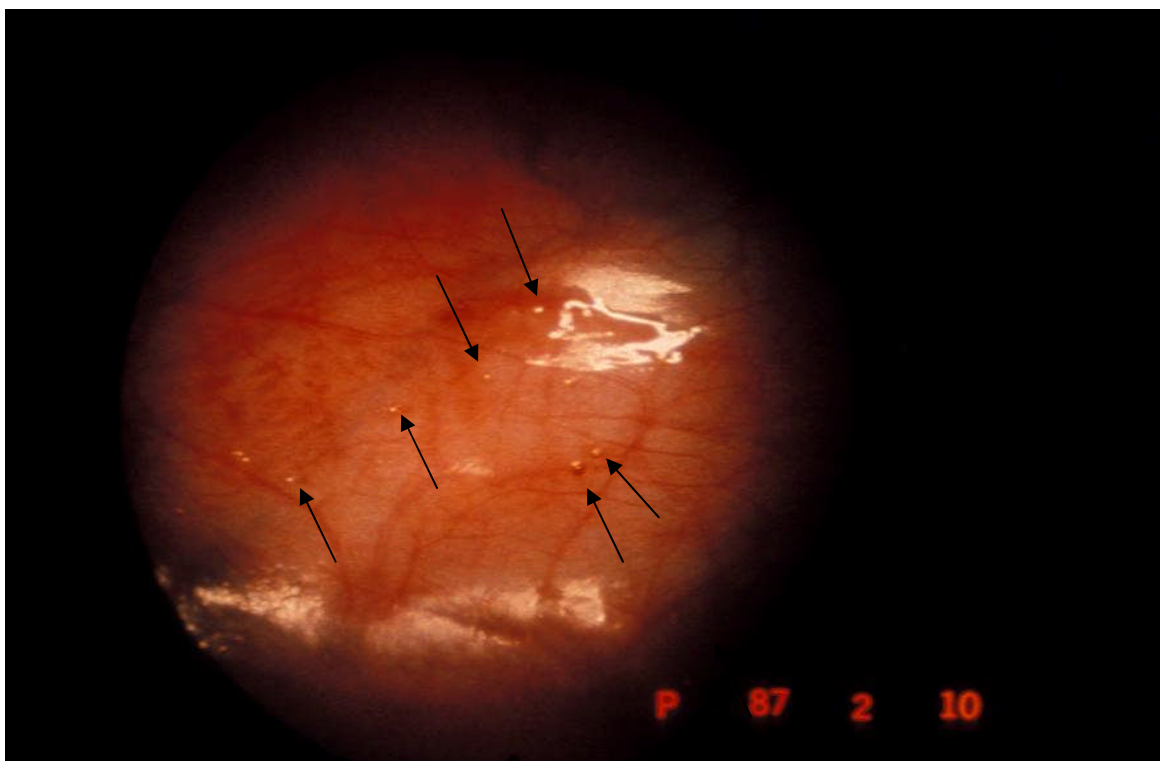


Figura 05: Pequenos pólipos rosa e pontos brancos. As lesões avermelhadas apresentam 400 micras de diâmetro. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

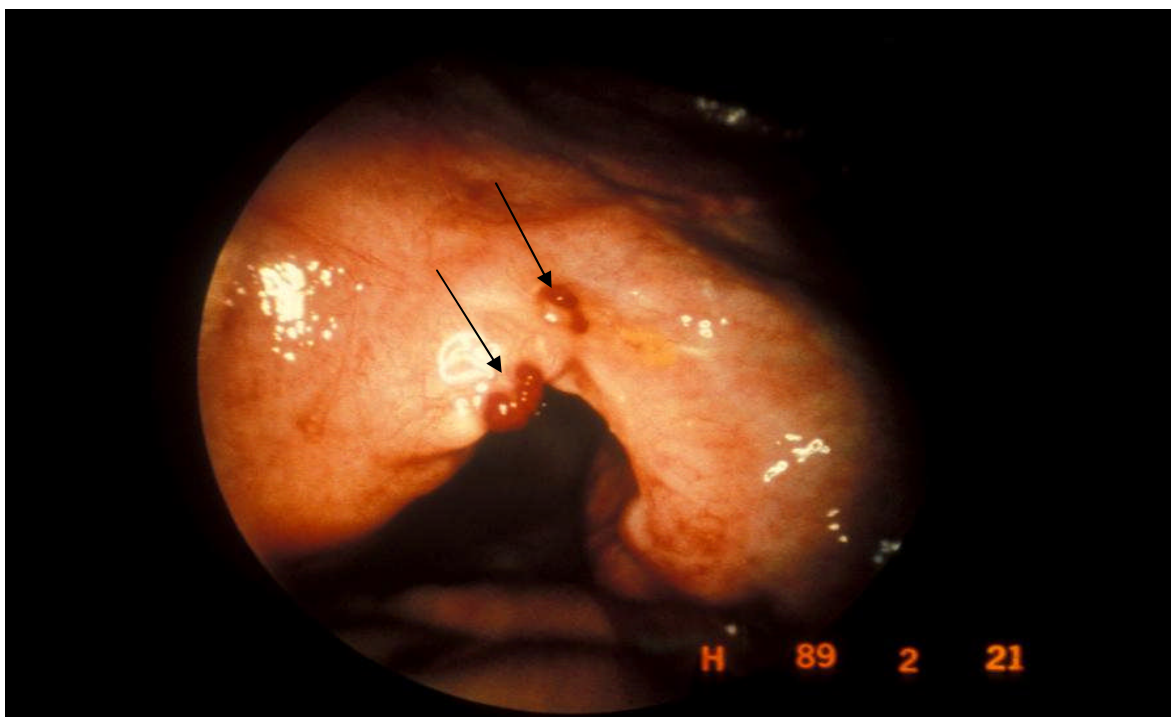


Figura 06: Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

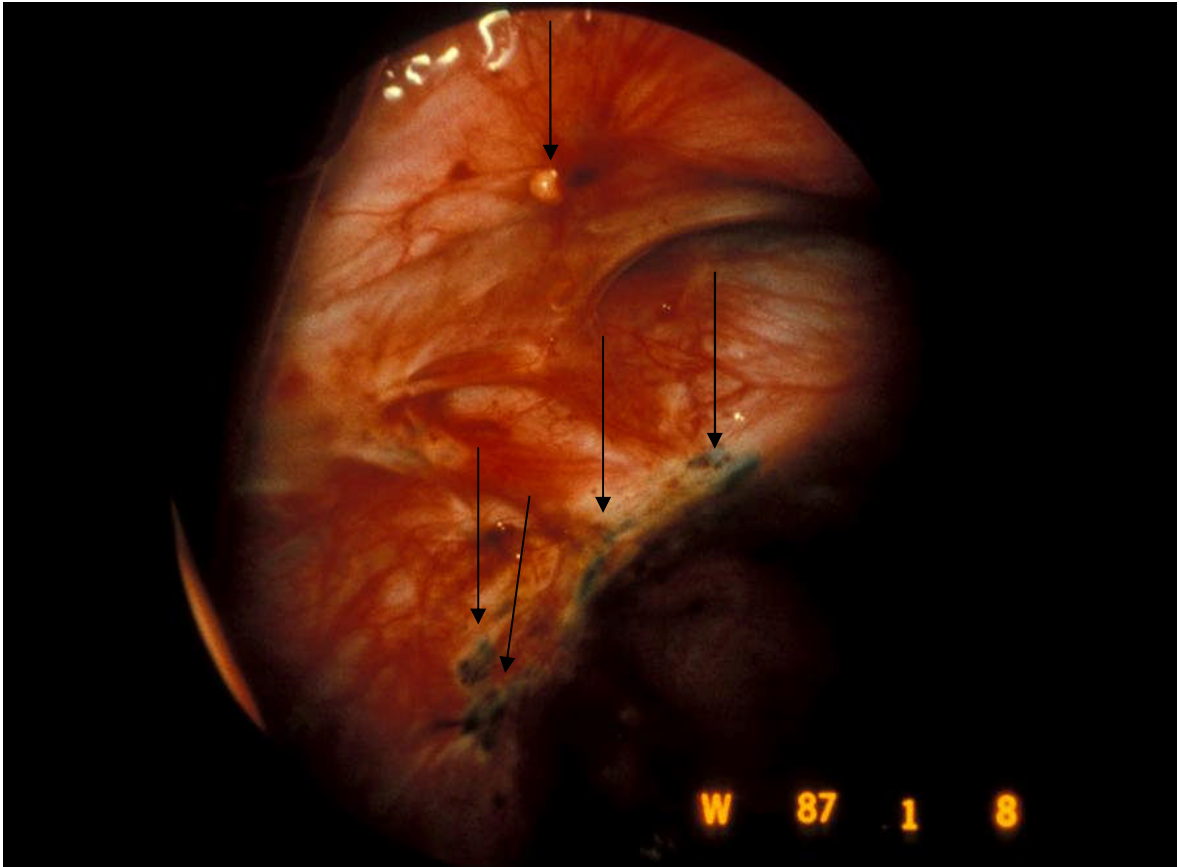


Figura 07: Quando áreas cicatriciais brancas são associadas com pólipos vermelhos geralmente é endometriose. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

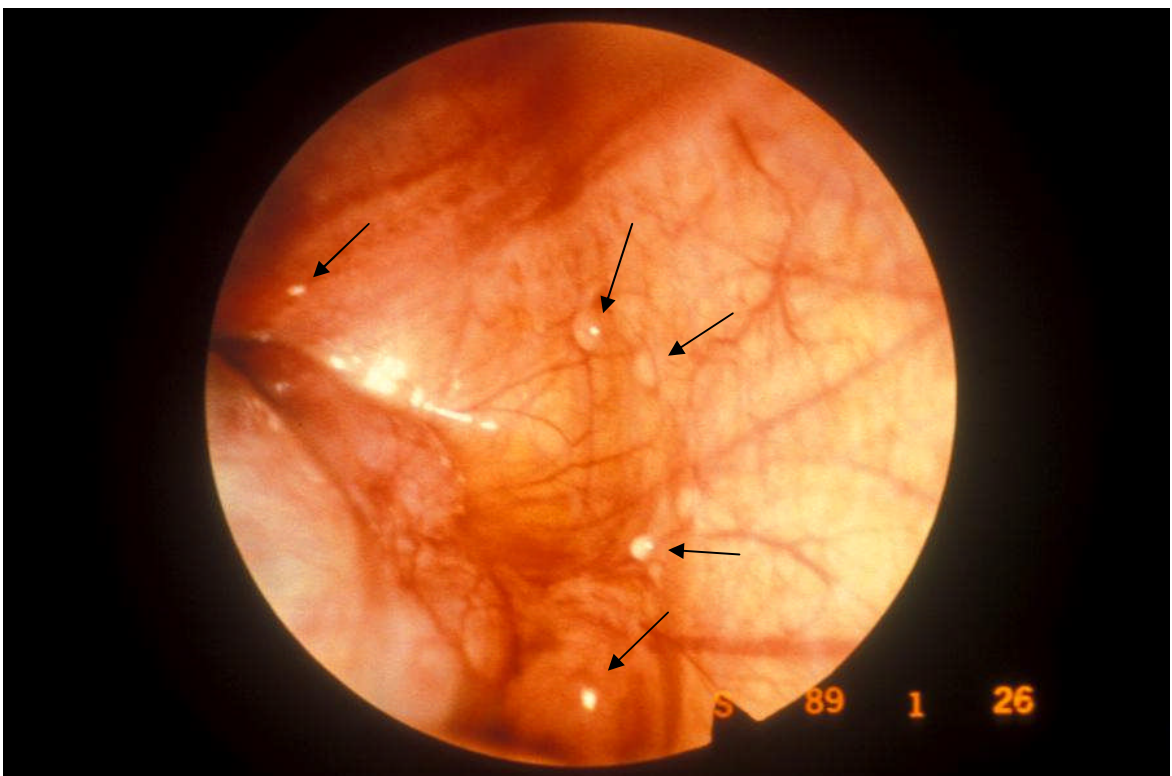


Figura 08: Pólipos claros e vesículas pode ser endometriose. Estas lesões são notadas lateralmente à tuba direita. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

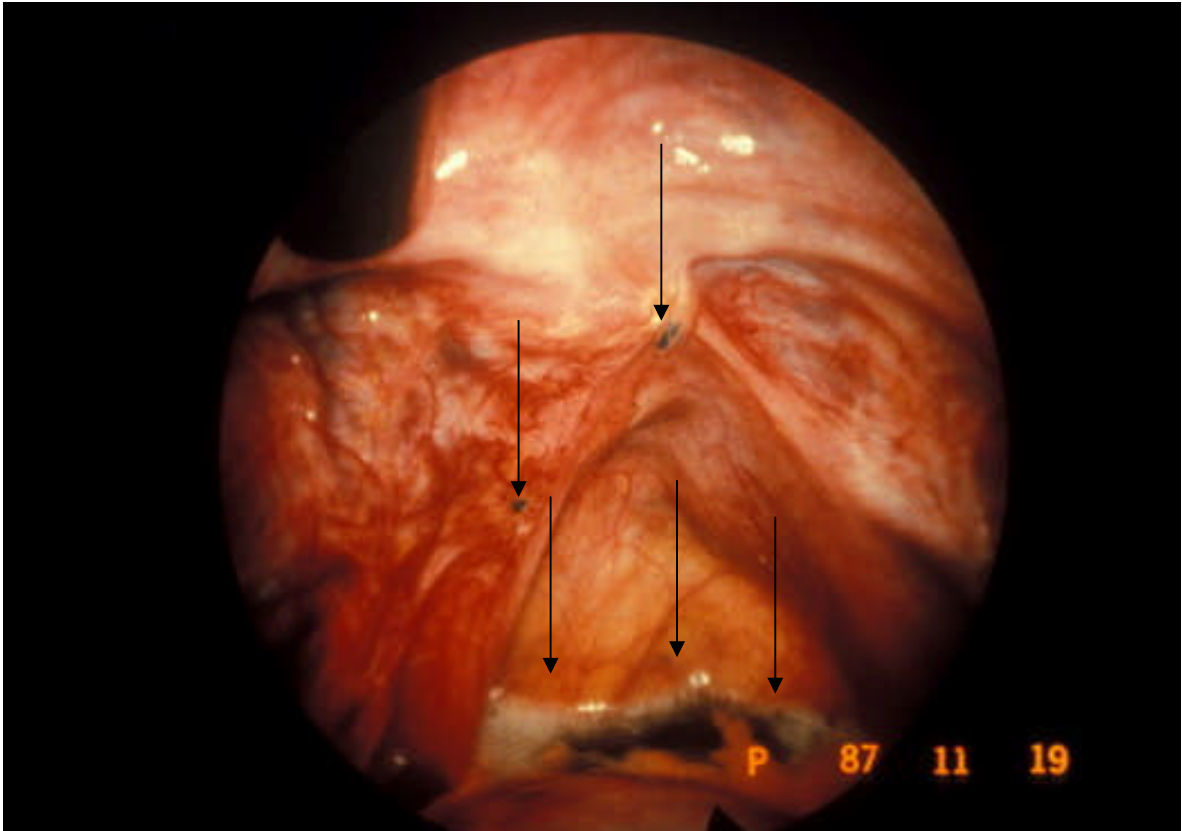


Figura 09: Endometriose em fundo ligamento útero-sacro. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

Quando presente no ovário, os cistos endometrióticos podem ter vários centímetros e são chamados endometriomas ou “cistos de chocolate” (Figura 10). (Muse e Fox, 1994). No ovário, a endometriose se comporta de maneira diferente do que nos outros tecidos. Isso ocorre devido à alta concentração de hormônios e fatores de crescimento presentes no interior do ovário. Sua integridade estrutural é alterada pela formação de cistos funcionais e sua superfície é interrompida temporariamente no período da ovulação (Nezhat *et al.*, 1992).

Na superfície dos ovários podem ser encontradas lesões semelhantes às encontradas nas outras regiões do peritônio. Também podem ser encontrado endometriomas que são formados pela invaginação do córtex ovariano. A superfície frontal, perto do hilo ovariano, é a região onde geralmente este processo ocorre (Brosens, 1997).

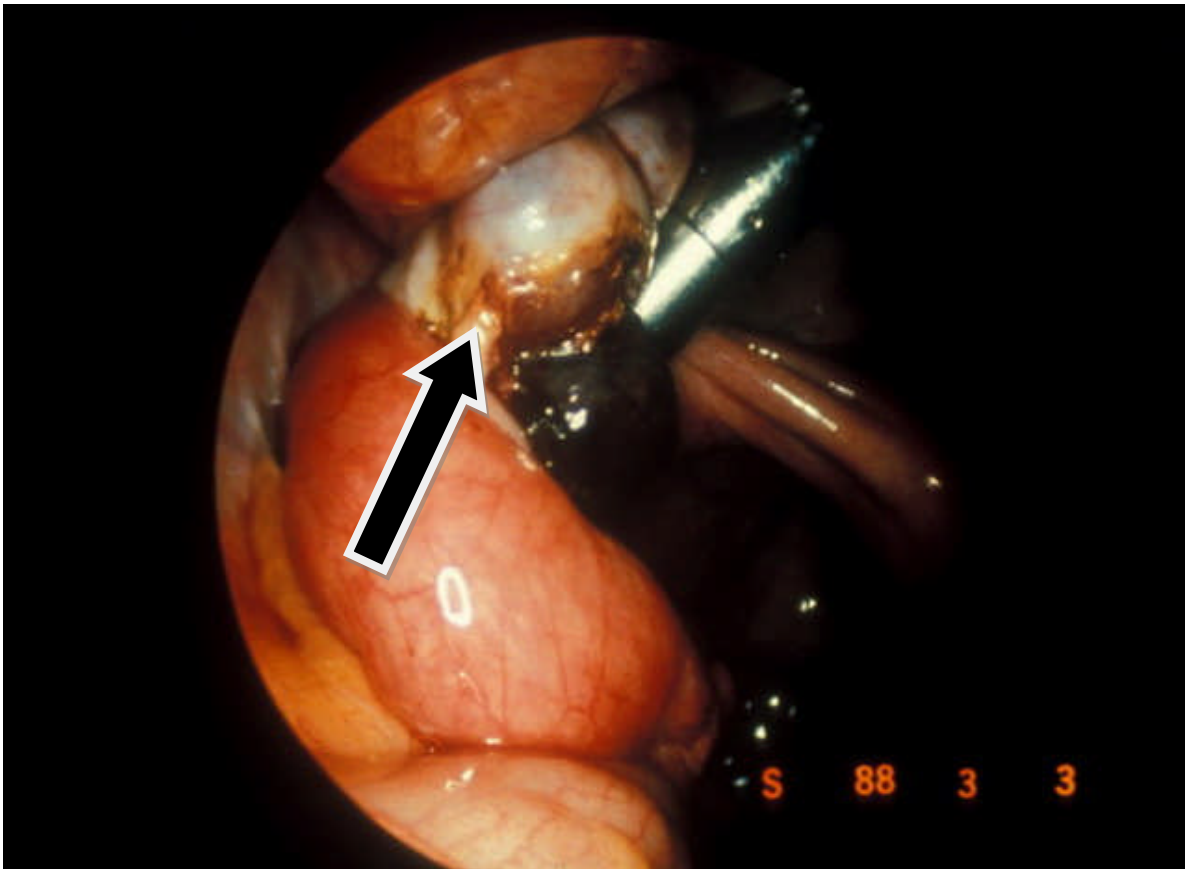


Figura 10: Endometrioma ovariano. Sangramento “achocolatado”. (Fonte: Martin *et al.*, 2007).

Nos estádios iniciais dos cistos endometrióticos, o córtex ovariano ainda pode ser reconhecido pelo seu aspecto perolado. Os implantes endometriais são indetectados por seu aspecto avermelhado, vascularizado, ou como ilhotas hemorrágicas no local da retração ou mesmo espalhadas pelo córtex ovariano (Nisolle *et al.*, 1990).

O aprofundamento das lesões com a formação dos endometriomas parece ser o resultado do processo seqüencial. A partir dos implantes superficiais, há formação de aderências, invaginação do córtex, implantes na parede cortical invertida, secreção de material sanguinolento e formação de cisto. Nos cistos maiores é comum a combinação com a presença de cistos hemorrágicos funcionais (Brosens, 1989).

A distensão progressiva do cisto com fibrose da parede esconde a lesão original e produz superfície de pigmentação escura, fibrótica e pobre em vascularização. Por este

processo, a endometriose superficial do ovário parece resultar em endometriose dita profunda, ou endometrioma (Reich *et al.*, 1991).

1.2.4 – Endometriose – Classificação

Muitos esforços têm sido feitos para criar uma classificação ideal, baseada no grau de severidade da doença, a fim de nortear o tratamento. Numerosas classificações foram descritas desde a época de Sampson. A classificação de Acosta *et.al.* (Anexo I) é da preferência de muitos por sua simplicidade e de utilidade para a documentação direta entre o sucesso da cirurgia e a severidade da doença (Giordano, 1998).

Como foi anteriormente citado, existem inúmeras classificações e como cada autor de trabalhos científicos utiliza a que mais lhe conviesse, tornou-se necessária uma classificação padronizada que fosse universalmente aceita. Para isso a *American Fertility Society* formou, em 1978, um comitê para criar uma classificação aceitável para todos. A classificação foi aperfeiçoada e revisada em 1985 (Anexo II) (Giordano, 1998).

A determinação do estágio ou grau do comprometimento da endometriose baseia-se num sistema de pontos. Deve-se fazer uma avaliação completa da pelve com base nos achados da cirurgia laparoscópica, observando-se número, dimensão, localização e intensidade de aderências periovarianas e/ou peritubáricas e grau de obliteração do fundo-de-saco de Douglas. A soma dos pontos determinará o estágio da doença (Giordano, 1998).

1.2.5 – Endometriose e infertilidade

A endometriose é uma doença que incide como já relatado anteriormente, principalmente em mulheres em idade reprodutiva. A doença pode estar relacionada com infertilidade em 30% a 40% dos casos. Estima-se que ao menos 25% de todas as mulheres

aos 30 anos apresentem endometriose e, entre estas, 30 a 50% que apresentam a doença são inférteis (Wheeler, 1989 e Adamson, 1996).

Os possíveis mecanismos como a endometriose ocasiona a infertilidade são:

(a) Distorção da anatomia pélvica. A presença de aderências poderia prejudicar a liberação do oócito pelo ovário ou ainda inibir a capacitação do oócito e seu transporte.

(b) Alteração da função peritoneal. Estudos demonstraram que mulheres com endometriose apresentam aumento do líquido peritoneal, aumento das concentrações de macrófagos ativados e aumento das concentrações de interleucina-I, fator de necrose tumoral e proteases no líquido peritoneal (Halme *et al.*, 1982)..

(C) Interferência com a ovulação: (anovulação; fase lútea deficiente; LUF (síndrome da luteinização do folículo não-roto) (Moura *et al.*, 1999).

A análise ultra-sonográfica detectou LUF nas pacientes com diagnóstico de endometriose entre 4 a 34% dos casos. A síndrome do folículo não roto e luteinizado foi proposta como um fator facilitador para o desenvolvimento da endometriose (Koninckx 1992), uma vez que a concentração de progesterona no fluido peritoneal era muito inferior a obtida nas mulheres ovulatórias. Acredita-se que a presença de concentrações altas de progesterona no fluido normal poderia dificultar a implantação, a sobrevivência e a proliferação das células endometriais regurgitadas da cavidade uterina; produção contínua de progesterona até a fase folicular seguinte. (a) falha de uma luteólise adequada; (b) diminuição da produção de células da granulosa; (c) Interferência na captação do óvulo por aderências peri-ovarianas; aderências tubo-ovarianas; fixação dos ovários; inibição da captação ovular; (d) Interferência com o transporte do óvulo aumento da motilidade tubária; salpingite crônica; aumento no volume do líquido peritoneal; (e) Interferência com a fertilização aumento da fagocitose dos espermatozóides pelos macrófagos; diminuição da penetração espermática; diminuição da fertilização; diminuição da clivagem;

(f) Interferência com a implantação defeitos da fase lútea; anticorpos anti-endometriais; (g) Interferência com outros hormônios promovem aumento da secreção de prostaglandinas; associação com hiperprolactinemia; duplo pico de LH; (h) Interferência com o desenvolvimento da gestação alterações na clivagem e desenvolvimento embrionário; aumento dos abortos espontâneos (Halme *et al.*, 1982).

Os mecanismos pelos quais a endometriose leva à infertilidade ainda não são totalmente conhecidos. Em mulheres com endometriose em estágio mais avançado, as alterações anatômicas, como obstrução tubária, aderências entre as estruturas pélvicas podem perfeitamente explicar a infertilidade em consequência de comprometimento da postura ovular, da captação do oócito e/ou do transporte do embrião. No entanto os mecanismos pelos quais a endometriose causa infertilidade em pacientes que não apresentam modificações anatômicas importantes (endometriose mínima ou leve) ainda não são bem claros. Dois fatores têm sido descritos (Fakih *et al.*, 1997):

Alterações do líquido peritoneal – sua quantidade pode estar ou não aumentada. O que na realidade parece ser de importância são as alterações de alguns de seus componentes celulares, como os macrófagos e a produção aumentada de substâncias como a interleucina-1, prostaglandinas e inibidores da captação ovular (Muzii *et al.*, 2000).

Disfunção ovulatória – tem sido descrita anovulação em pacientes com endometriose numa incidência variando de 17% a 27%, embora não se saiba ao certo qual o mecanismo envolvido. Uma possibilidade seria a hiperprolactinemia. Tem sido observado aumento dos níveis de prolactina após a estimulação com TRH em pacientes com endometriose, sugerindo que essas pacientes tenham uma maior capacidade de secreção de prolactina do que em mulheres saudáveis. A síndrome de LUF síndrome do folículo luteinizado não roto em outras palavras ocorre quando o folículo ovariano desenvolve-se normalmente, mas não rompe para liberar o óvulo; depois, as células que o compõe iniciam a secreção de

progesterona, tal como um folículo que rompeu e se transformou em corpo lúteo, daí as dosagens de progesterona serem normais (Acosta e Sueldo, 1996).

Não se sabe a causa da LUF e o objetivo de vários estudos é tentar estabelecer sua associação com endometriose, porém não se conseguiu estabelecer se é causa ou simplesmente uma patologia associada. Níveis baixos de LH em folículos dominantes vêm sendo responsabilizados pela ocorrência de síndrome de LUF e outras disfunções ovulatórias. Insuficiência lútea – tem sido descrita em pacientes com endometriose e poderia ser consequência de hiperprolactinemia, síndrome de LUF, e de alterações do LH, porém os estudos quanto ao seu papel no mecanismo causador de infertilidade na endometriose não são unânimes (Aldrighi, 2005).

Distúrbios de implantação – há evidências de produção de anticorpos antiendometriais em pacientes com endometriose, detectados nos implantes através de técnicas de imunofluorescência e no soro das pacientes. Aventa-se que esses anticorpos poderiam interferir no fenômeno de implantação do ovo e até contribuir para abortamento precoce nessas pacientes (Vigano, 1991).

1.2.6 – Endometriose – tratamento

1.2.6.1 – Tratamento expectante e sintomático

Alguns autores preconizam que em caso de endometriose mínima e a paciente com desejo de engravidar imediatamente que apenas se observe a paciente e no máximo o uso de analgésicos. A endometriose melhora durante a gravidez. A crítica que se faz é que, caso não ocorra a gravidez, poderá ocorrer um agravamento da doença (Rodrigues de Lima e Baracat, 1995).

1.2.6.2 – Tratamento cirúrgico

É feito por laparoscopia após diagnóstico, estadiamento e biópsia da lesão para estudo histológico e, portanto confirmação anatomopatológica da doença.

A laparoscopia deve ser realizada de maneira meticulosa, mas tendo cuidado para ser o menos traumático possível. Inicialmente se faz uma avaliação panorâmica da pelve, abdome, cavidade peritoneal, fundo de saco de Douglas, líquidos peritoneais, ligamentos útero-sacos, ovários, tubas e finalmente a cromotubagem, em que se injeta no canal cervical uma solução contendo azul de metileno sob pressão e observa se ocorre ou não a saída deste líquido pelas fímbrias (Brosens, 1997).

Nos estádios iniciais, o tratamento da endometriose tem como objetivo a completa destruição da lesão endometriótica com o mínimo de lesão tecidual; as lesões peritoneais superficiais devem ser tratadas com eletrocauterização bipolar, microcautério bipolar, vaporização com laser de CO₂ e endocoagulação. Deve-se evitar o uso de eletrocautério monopolar, uma vez que pode provocar lesão de estruturas mais profundas ou a distância. O laser de CO₂ apresenta a vantagem da precisão na ressecção ou vaporização das lesões. O prognóstico de fertilidade é semelhante se utilizado a eletrocoagulação ou o laser de CO₂ (Donnez *et al.*, 1989).

A superfície ovariana, principalmente a sua face peritoneal, muitas vezes é sede de focos de endometriose, devendo ser tratada de forma semelhante à das lesões peritoneais superficiais. Deve-se ter o cuidado de não lesar o ligamento útero-ovárico e fímbrias, o que comprometeria a vascularização do ovário e a mobilidade fimbrial, respectivamente (Catalano *et al* 1996).

Freqüentemente as lesões endometrióticas são acompanhadas de aderências peritoneais, devendo-se fazer a adesiólise de forma delicada, utilizando tesoura ou hidrodissecção, para restabelecer a anatomia original (Kojima *et al.*, 1990).

As opções cirúrgicas para o tratamento da dor pélvica são ablação parcial dos ligamentos útero-sacros e neurectomia pré-sacral, nos casos graves (Donnez *et al.*, 1996).

Por fim, faz-se lavagem peritoneal exaustiva para remover o líquido peritoneal e melhorar a qualidade do ambiente peritoneal, deixando-o livre de substâncias citotóxicas (Mathis *et al.*, 1995).

1.2.6.3 – Tratamento clínico complementar

Há controvérsias quanto ao tratamento ideal para a endometriose, devido à etiologia ainda desconhecida da doença e das razões pelas quais ocorrem a dor pélvica e a esterilidade nestas pacientes. A determinação de uma conduta terapêutica padronizada deve ter por base alguns preceitos desta patologia, tais como (Abrão, 2000):

- Alterações imunológicas que participam de sua gênese, além da menstruação retrógrada.
- Dentre os vários tipos de endometriose, destacam-se a doença de ovário, peritônio e septo reto-vaginal, onde estas variedades podem coexistir.
- A doença peritoneal pode ser representada por lesões típicas ou negras e atípicas. Das atípicas, as lesões vermelhas são as que mais produzem prostaglandinas e, conseqüentemente, levam à maior resposta inflamatória.
- Os implantes apresentam dependência hormonal.
- A resposta terapêutica depende de vários fatores, como estadiamento, localização, resposta imunológica, profundidade de invasão ou classificação histológica.
- É indiscutível o tratamento da doença em seus estádios iniciais.

Nas pacientes sem intenção de gravidez, há uma tendência de se usar contraceptivos hormonais. São utilizados anticoncepcionais hormonais orais (ACHO) por sua ação

antiestrogênica. Também são utilizados injeções de medroxiprogesterona, AMP-D, na dose de 150mg trimestrais, objetivando a amenorréia. Outra opção são os implantes de progesterona, que pode ser usado via subcutânea ou intra-uterina.

Nos casos de doença nos estádios III e IV pela *American Fertility Society*, revisada em 1985 e atualizada em 1996, o tratamento poderá ser realizado com análogos do GnRH, danazol, gestrinona ou até progestágenos puros. Podem ser usados ACHO contínuo, AMP-D ou implantes, mas há uma tendência de se usar os análogos do GnRH por apresentar melhor efeitos colaterais e maior objetividade da obtenção dos efeitos antiestrogênicos. Este tratamento dura, em geral, de quatro a seis meses com controle, de 10 a 20 dias após a terceira ampola do análogo de depósito ou após três meses de uso, por via nasal, do estradiol sérico, CA-125 e ultra-som (Abrão, 2000).

1.2.6.4 – Recorrências

Analisando diversos trabalhos conclui-se ser comum o reaparecimento da doença algum tempo após o término do tratamento. Segundo Thomas (1995) a taxa de recorrência é de aproximadamente 11% por ano após o tratamento hormonal. Esse autor pondera que se a menstruação é o principal fator etiológico da doença, uma vez que ela retorna, há um potencial para recorrência tanto após tratamento clínico, como cirúrgico conservador (Giordano, 1998).

Provavelmente seria melhor considerar a endometriose como uma doença crônica recorrente que pode ser controlada através de medicamentos ou de cirurgia conservadora, porém não curada. O autor considera o retorno dos sintomas dentro de seis meses como falha de tratamento e recomenda o emprego de uma nova estratégia de tratamento (Giordano, 1998).

Quando os sintomas retornam após seis meses do término do tratamento, considera-se como recorrência espontânea, a despeito do tratamento eficaz, recomendando que o mesmo seja repetido. Falhas posteriores requerem mudança de tratamento. Conclui-se que o único tratamento para a doença severa, recorrente e resistente seria a cirurgia radical (Giordano, 1998).

1.2.7 - p53

1.2.7.1 – Proteína p53

O gene supressor de tumor *p53* encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 KiloDaltons (kDa), denominada p53 em consequência do seu peso molecular. Esse gene possui 20 Kb e é composto por 11 éxons, sendo o primeiro não-codificante, e altamente conservado, apresentando homologia estrutural entre diferentes espécies (Almeida *et al.*, 1986).

A proteína p53 é constituída por 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína (Figura 12). O primeiro chamado de domínio de transativação está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal), estando compreendido entre os aminoácidos 28 e 42, sendo responsável por regular a expressão de genes que atuam na mediação da parada do ciclo celular e apoptose (Klumb *et al.*, 2002).

Na região central existem quatro domínios de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 102 e 292, que possibilitam a ligação de p53 em sítios específicos do DNA. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal) existem dois domínios: o domínio de tetramerização, que situa entre os aminoácidos 319 a 360, é responsável pela formação de tetrâmeros de P53, que é a forma mais ativa (selvagem ou *wild type*) em transativação; o

domínio regulatório, que se situa entre os aminoácidos 364 a 393, cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (Silva *et al.*, 2003).

Uma vez ativada por fosforilação na extremidade N-terminal, a p53 não é capaz de ligar-se ao DNA de maneira específica. A ligação não-específica é causada pela ligação da extremidade C-terminal com o domínio central, bloqueando este domínio que pode ser revertido. Assim, a proteína p53 pode se ligar de maneira específica ao DNA, agindo como fator de transcrição. Essa ativação da proteína por fosforilação e acetilação ainda é controversa, mas a modificação de p53 faz com que essa proteína possa atuar como fator de transcrição através da ligação em seqüências específicas, promovendo a transativação *downstream* de genes alvos (Silva *et al.*, 2003)..

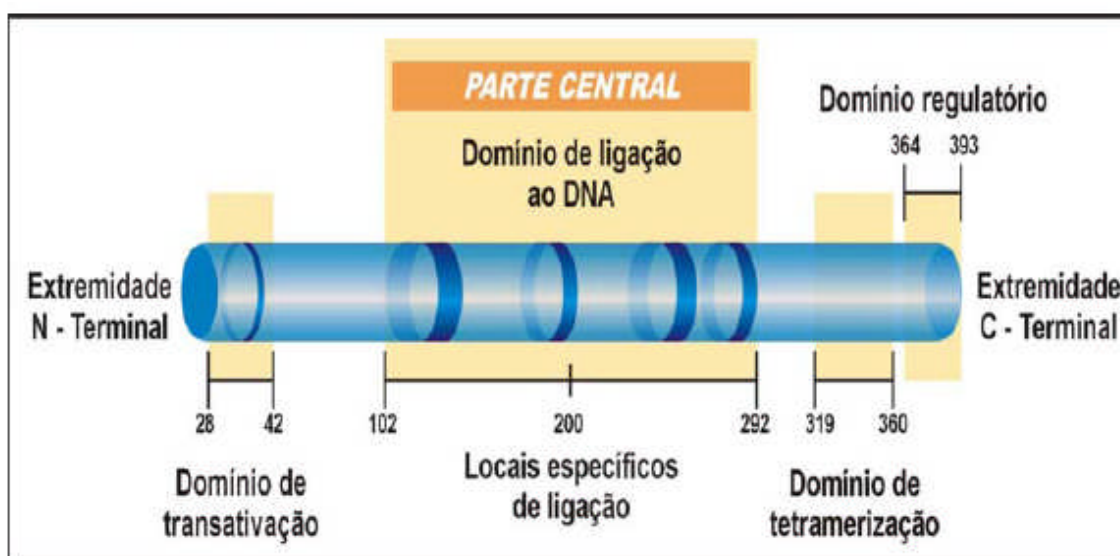


Figura 11: Desenho esquemático da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53 (Fonte: Oliveira, 2005).

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo então referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (Lane e Crawford, 1979). Sob condições fisiológicas normais, apresenta uma meia vida muito curta, calculada em 6 minutos, tornando difícil

sua detecção em razão da rápida degradação, o que não ocorre com o acúmulo da forma mutada no núcleo da célula, podendo ser facilmente detectada por técnicas de imunohistoquímica, *Western blot*, ou por citometria de fluxo (Silva *et al.*, 2003)..

1.2.7.2 – Proteína p53. Função

O termo “guardião do genoma”, atribuído à proteína p53 é decorrente da sua função como “policia molecular”, por monitorar a integridade do genoma. Atua como um sensor de danos no DNA e auxilia o sistema de reparo, utilizando os momentos de *checkpoints* para paralisar o ciclo celular ou induzir a apoptose, prevenindo, assim, que ocorra a proliferação de células com o DNA mutado (Levine *et al.*, 1991). Durante o ciclo de divisão celular, a p53 faz uma verificação se há eventual ocorrência de mutações na seqüência do genoma, em consequência de uma replicação defeituosa do DNA. No caso de lesões por agentes físicos, químicos ou biológicos, é função da p53, através de uma cascata de reações, impedirem que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular. Assim dois caminhos podem ser seguidos: a correção da mutação através da ativação da proteína de reparo ou a indução a apoptose (Rivoire *et al.*, 2001).

O dano ao DNA desencadeia rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da fosforilação da proteína. Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a super expressão e com o consequente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA. No início do ciclo mitótico, o gene *p53* ativa transcricionalmente o gene *p21*, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA.

Para tanto, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*), que atua corrigindo a lesão no DNA. Caso a lesão seja extensa, a p53 ativa genes envolvidos no mecanismo de apoptose, suprimindo a ação de genes com ação antiapoptótica. Nas células que apresentam o gene *p53* mutado e inativação da proteína p53, não ocorre a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA (Cavalcanti Júnior *et al.*, 2002). Essas células geneticamente instáveis tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica.

1.2.7.3 – Controle da expressão de p53

Pelo papel que a proteína p53 desempenha e por se tratar de uma molécula com potencial para causar importantes alterações na célula, a concentração de p53 bem como suas atividades são reguladas e mantidas sob um rígido controle. Um dos processos para manter os níveis de p53 baixos é a degradação dessa proteína. Nesse contexto o oncogene *MDM2* (*Mouse Double Minute 2*) é importante, pois codifica uma proteína de mesmo nome e é um gene ativado por p53. A proteína MDM2 se associa ao domínio de transativação de p53, inibindo sua transcrição regulatória funcional, o que diminui a indução da apoptose e a parada do ciclo celular. Também é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, onde é degradada por uma via de ubiquitinação.

O transporte do complexo MDM2/p53 do núcleo para o citoplasma é mediado por proteínas exportinas que se ligam à MDM2 expondo o p53 a ubiquitinação e a complexos proteolíticos que, no final de suas ações, favorecem o controle negativo de p53. Assim, MDM2 atua como uma E3-ubiquitina-ligase, a qual se liga nos domínios de transativação da proteína e transporta p53 para o citoplasma onde é degradada (Fernandes *et al.*, 2002).

Essa regulação negativa da proteína p53, exercida pela proteína MDM2, pode ser neutralizada pela ação do produto de um gene supressor de tumor denominado *p14 ARF* (*ARF Alternative Reading Frame*) que é capaz de se ligar à proteína MDM2 e impedir qualquer ligação a p53. A proteína p14ARF também pode degradar a MDM2 causando a liberação de p53 do complexo no núcleo (Nylander *et al.*, 2000).

A proteína p53 possui sinais de localização nuclear, chamados NLS (*Nuclear Localisation Signals*), os quais na maioria se localizam na extremidade C-terminal, permitindo a sua entrada no núcleo. Recentemente foi demonstrada a existência de um sinal de exportação nuclear, denominado NES (*Nuclear Export Signal*), na extremidade C-terminal, no domínio de tetramerização da proteína.

Quando a p53 está em forma de tetrâmero, o NES fica inacessível às exportinas, mas se a p53 se encontrar no estágio de dímero ou monômero, as exportinas podem se ligar a NES e a p53 poderá ser lançada para o citoplasma independentemente de MDM2. O acúmulo de p53 selvagem pode refletir uma resposta ao dano persistente do DNA pela atividade de carcinógenos, o que pode suportar as observações de que a super expressão de p53 é um indicador de transformação maligna (Garay *et al.*, 2003).

1.2.7.4 – Perda da função da proteína p53

A perda da função da proteína p53 pode ocorrer pelas seguintes situações: por alteração genética; por interação da proteína p53 com proteínas virais; e por interação da proteína p53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular. As alterações genéticas podem ser: mutação pontual (*Missense*), deleção gênica (*Non Sense*) de um ou dois alelos do gene *p53* e inserção de nucleotídeos na seqüência de DNA. Mutação pontual é a troca de um nucleotídeo, e é o tipo de mutação do gene *p53* mais frequentemente encontrado nas

neoplasias. Essas mutações ocorrem principalmente entre os códons 120 e 290, situados entre os éxons 5 e 9, considerados sítios quentes (*hot spots*) de mutação, e resultam na transcrição de uma proteína não funcional (Klumb e Cavalcanti Júnior, 2002). A deleção gênica, por sua vez, pode levar à transcrição de um códon de parada prematuro da proteína.

Uma mutação no gene *p53*, seja pontual ou não, altera de forma significativa a proteína p53, o que resulta na incapacidade de efetuar a parada do ciclo celular ou disparar o mecanismo de apoptose. As formas mutadas da proteína apresentam ainda a capacidade de interagir com a proteína selvagem, impedindo a supressão tumoral. Este fenômeno é conhecido como “efeito dominante negativo”, visto que a mutação de um dos alelos do gene *p53* produz o que parece ser um efeito dominante sobre o alelo normal restante (Lemos, 1995).

A síndrome de Li-Fraumeni é uma rara síndrome autossômica dominante, caracterizada por mutações herdadas que ocorrem na linhagem germinativa do gene *p53* e por um fenótipo clínico de múltiplas neoplasias primárias (Li; Fraumeni, 1969). É uma síndrome de predisposição ao câncer e os portadores possuem uma probabilidade de vinte e cinco vezes mais chances de desenvolver vários tipos de tumores malignos (Felix *et al.*, 2002).

1.2.7.5 - Heterozigosidade de *p53*

A perda somática de um alelo de um gene supressor de tumor envolve freqüentemente a perda do material cromossômico, variando em extensão desde algumas centenas de pares de bases a uma sub-banda ou até ao cromossomo completo. Estes eventos são chamados de perda de heterozigosidade LOH (*Loss Of Heterozygosity*), que consiste na comparação de *loci* polimórficos do DNA extraído de um tecido normal e de um tumoral do mesmo indivíduo (Osborne e Ham Shere, 2000). A análise de LOH já

identificou várias regiões cromossômicas com perdas em tumores, processo fundamental na carcinogênese. A maioria das LOH é resultante da instabilidade genética e está associada ao fenótipo maligno em razão das mutações ou deleções adicionais no alelo normal, sendo então necessários à inativação ambos os alelos (Ferrerias *et al.*, 2001).

A predisposição individual está relacionada à alta probabilidade de ocorrer uma inativação somática adicional do alelo *p53* normal, seja por rearranjo cromossômico ou por mutação de ponto em uma das células do indivíduo (Brookes, 1999).

1.2.7.6 - Polimorfismo de *p53*

À medida que as seqüências nucleotídicas do genoma humano foram sendo desvendada, uma constatação evidente foi a do grande número de variações de ponto encontradas, ao se comparar segmentos correspondentes do genoma. Comumente estas mutações que ocorrem a cada 600 bases, aproximadamente, são denominadas polimorfismos de nucleotídeos únicos ou SNPs (*Single Nucleotids Polimorphisms*) e correspondem a posições em que existe uma alternância dos nucleotídeos em uma freqüência alélica mínima de 1% (Guimarães e Costa, 2002). Os SNPs podem promover *splicing* alternativo, alterando o padrão ou a expressão de genes quando ocorrem em seqüências de promotores, gerando ou suprimindo códons de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e causando, assim, alterações na iniciação da tradução (Kwok e Gu, 1999).

Quando essas mutações ocorrem em células germinativas e são transmitidas às gerações futuras e se fixam na população em uma freqüência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismo (Hahn e Weiberg, 2002).

1.2.7.7 – A proteína *p53* e a endometriose

Em uma investigação na população chinesa, Chang *et al.* (2002) reportaram uma associação negativa entre a variante arginina com endometriose, sugerindo uma ação protetora do genótipo Arg/Arg contra a doença.(Hsieh e Lin, 2006). O estudo mostrou um aumento da incidência da patologia de cerca de 2 a 3 vezes quando a prolina está presente (Chang *et al.*, 2002). Tal resultado foi corroborado pelo estudo de Hsieh e Lin (2006) que concluíram que a associação entre endometriose e polimorfismo de p53 existe. Quando a arginina está presente em homozigoze ela está relacionada com baixa susceptibilidade de desenvolvimento de endometriose, enquanto que a presença de prolina (homozigoze ou heterozigoze) no códon 72 está relacionada com susceptibilidade mais alta de desenvolvimento da endometriose (Hsieh e Lin, 2006). Outros estudos, como o realizado na Itália por Lattuada *et. al.* (2004) em que foram comparados grupos de pacientes com endometriose (151mulheres) e sem endometriose (152 mulheres) mostrou que o alelo prolina (em homozigoze ou heterozigoze) estava mais presente nas formas mais severas da doença. Em outros estudos essa correlação entre polimorfismo do p53 no códon 72 e endometriose não ficou bem estabelecida, sugerindo que não apenas um, mas um conjunto de genes estaria funcionalmente relacionado com a doença, assim como fatores ambientais (Omuri *et al.*, 2004). .

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

- Avaliar o polimorfismo do gene p53 no códon 72 em dois grupos de pacientes com diagnóstico de endometriose, em que em um deles foi detectado infertilidade e no outro não.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência do polimorfismo do gene *p53*;
- Correlacionar a presença dos alelos prolina e arginina com endometriose com e sem infertilidade.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Casuística

Foram avaliadas 38 amostras de sangue periférico de pacientes entre 25 e 35 anos de um centro de referência em videolaparoscopia e infertilidade de Goiânia (FÉRTILE) com sinais e sintomas sugestivos de endometriose (tais como dismenorréia progressiva, dispareunia, dor pélvica, infertilidade ou ecografia com laudo sugestivo de endometriose), com indicação de videolaparoscopia para esclarecimento diagnóstico e tratamento.

Foi realizada a análise molecular para o polimorfismo do gene *p53* (no códon 72) em amostras de sangue

As pacientes foram divididas em dois grupos de 19 pacientes cada, sendo que no primeiro grupo estão aquelas com queixa de infertilidade e com intenção de gravidez, com histórico de ter tentado por pelo menos um ano. No segundo grupo, aquelas que já tiveram filho sem relato de dificuldades, mas que apresentam outras queixas ou exame ecográfico que sugere endometriose.

- GRUPO I

-Infertilidade (relato de tentativa de gravidez por pelo menos 01 ano);

-Cromotubagem (+)

- GRUPO II

-Outras queixas;

-Que tenha pelo menos um filho sem relato de dificuldade para engravidar

-Cromotubagem (+)

As pacientes foram submetidas à videolaparoscopia para a confirmação da presença da endometriose (em qualquer grau) e que não apresentaram nenhuma alteração anatômica que possa levar a infertilidade, como por exemplo, obstrução das trompas. A avaliação da permeabilidade tubária foi realizada durante a cirurgia de videolaparoscopia pela injeção

do corante azul de metileno pelo colo uterino canulado, sendo que a progressão e dispersão do contraste na cavidade abdominal se dão por visualização direta. Esse procedimento recebe o nome de cromotubagem. Quando a permeabilidade da trompa foi comprovada por este método, foi chamada cromotubagem positiva, se há obstrução a cromotubagem foi dita negativa.

Todas as pacientes responderam a um questionário (Anexo V), sobre idade, cor de pele, sintomas, duração dos sintomas, periodicidade dos sintomas, se há infertilidade, atividade física, fumo, álcool, uso de anticoncepcional, qual esquema e por quanto tempo, ritmo sexual e história obstétrica (número de gestações, de partos, de aborto de cesariana e a idade dos filhos).

Após a realização da laparoscopia as 38 pacientes foram classificadas quanto ao grau da endometriose:

- Grau I (mínimo)
- Grau II (leve)
- Grau III (moderado)
- Grau IV (severo)

As pacientes classificadas com grau III e IV foram medicadas com bloqueadores de GNRH (Lupron) por 6 meses (Kaupilla, 1993). As pacientes de grau I estarão teoricamente tratadas da endometriose pela cirurgia. As classificadas com grau II foram medicadas com anti-concepcional oral por seis meses (Giordano, 1998).

Os fatores de exclusão foram:

- 01) Pacientes submetidas à salpingectomia (fator tubário);
- 02) Parceiro com dois espermogramas comprometidos (fator masculino);
- 03) Anovulia persistente diagnosticada pela ecografia (fator ovariano) e
- 04) Teste pós-coito anormal (fator cervical).

Foi anexada uma cópia do resultado do anatomopatológico a partir da biópsia, constituindo, portanto, um fator de inclusão para aquelas que tiverem confirmação da endometriose pelo patologista.

Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás.

3.2 - Análise molecular

A partir do material coletado, a extração do DNA foi realizada a partir de instruções do GFX™ (*Amersham*, EUA) protocolo para sangue total. A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado no Sistema de Video Documentação VDS® (*Amersham Biosciences*, USA) (Figura 13).

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR, visando a detecção do polimorfismo no códon 72 do gene *p53*, usando *primers* específicos para *p53 ARG* e *p53 PRO*.

Como controle interno para DNA humano, foi utilizado o primer ZFX/ZFY que amplifica seqüências específicas dos cromossomos sexuais. E todas as análises foram realizadas em duplicatas. O produto obtido por cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose para *p53* e corado com brometo de etídio (5µg/mL) e o registro visual do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação. (*Image Master VDS® - Amersham Pharmacia Biotech*,EUA)

As 38 amostras coletadas para o estudo foram submetidas à análise do polimorfismo do códon 72 do gene *p53* pela técnica de PCR. Os produtos da PCR: *p53Pro* e *p53Arg* da mesma paciente foram misturados e 10 µl da solução foram carregadas em 3% de gel de agarose contendo brometo de etídio para eletroforese. O alelo arginina é representado por

fragmentos de 141 pb enquanto o alelo prolina por 177 pb . Linha 1 prolina homozigoze (PRO/PRO), linha 2 heterozigoze (PRO/ARG) e linha 3 arginina homozigoze (ARG/ARG) (Figura 19). (Bergamaschi *et al.*,2004).

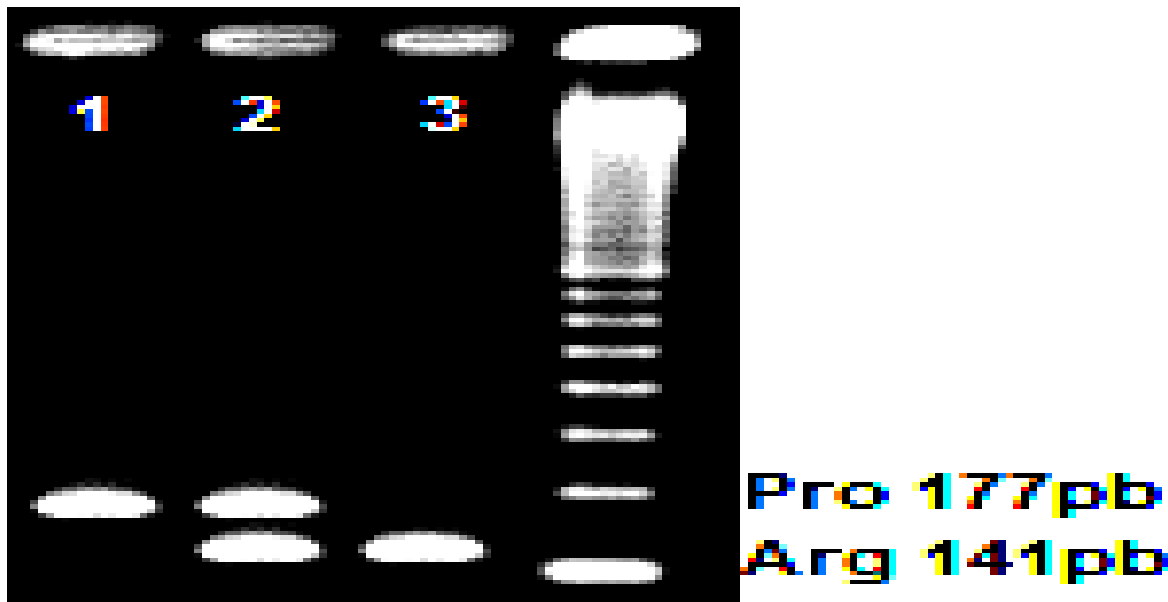


Figura 12: Foto do gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a cada primer utilizado na análise do polimorfismo do códon 72 do gene *p53*. Linha 1: heterozigoze PRO/PRO; linha 2: heterozigoze PRO/ARG; linha 3: homozigoze ARG/ARG. Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

Tabela I. Seqüência dos *primers* analisados nas amostras de DNA em pacientes com endometriose, com ou sem infertilidade. Goiânia, 2008.

Primer	Seqüência 5' → 3'	Tamanho (pb)
p53 ARG	F-5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC -3' R-5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3'	141
p53 PRO	F-5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC -3' R-5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG -3'	177
ZFX/Y	F-5' ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC -3' R-5' GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT -3'	495

pb: pares de base; R= A/G; Y= C/T (Fonte: Storey *et al.*,1998).

3.3 – Análise estatística

As análises de estatística descritiva foram realizadas para as variáveis relativas aos pacientes e aos aspectos clinico-patológicos. O teste do qui-quadrado e o teste de Odds Ratio foram utilizados para a verificação da análise molecular e os dados clínicos e histopatológicos. O programa BioEstat® 3.0 (*Sociedade Civil Mimirauá/MCT – CNPq*) foi utilizado para realizar os testes.

4 – RESULTADOS

O grupo I (pacientes com infertilidade) e o grupo II (pacientes férteis) foram avaliados segundo a presença do alelo arginina e prolina em cada grupo (19 pacientes em cada) e foram representados na Tabela II.

Encontramos 21,0% (04 pacientes) ARG/ARG no grupo I, 47,4% (09 pacientes) ARG/ARG no grupo II; 73,7% (14 pacientes) PRO/ARG no grupo I e 52,0% (10 pacientes) PRO/ARG no grupo II. 5,3% (01 paciente) PRO/PRO no grupo I e 0,0% (00) PRO/PRO no grupo II. Não houve diferença significativa entre Grupo I e II para os genótipos analisados.

Tabela II – Frequência dos alelos ARGININA E PROLINA e os grupos do estudo (pacientes com endometriose): I (inférteis) e II (férteis). Goiânia, 2008.

VARIÁVEL	GRUPO I (INFÉRTEIS)		GRUPO II (FÉRTEIS)	
	%	N	%	N
ARG/ARG	21,0	04	47,4	09
ARG/PRO	73,7	14	52,6	10
PRO/PRO	5,3	01	0,0	00
Total	100,0	19	100,0	19

P = 0,166

Na tabela III foi correlacionada a queixa da paciente (dor/sangramento, infertilidade + dor/sangramento ou infertilidade) com os alelos avaliados (ARG/ARG, PRO/ARG e PRO/PRO).

Das pacientes com arginina em homozigose (ARG/ARG) 47,4% (09) apresentavam queixa de dor e/ou sangramento, 0,0% (00) apresentavam infertilidade associada á dor e/ou sangramento e 71,4% (05) apresentavam apenas queixa de infertilidade.

Já nas pacientes com prolina em homozigose ou heterozigose (PRO/PRO ou

PRO/ARG) 52,6% (10) apresentaram queixa de dor e/ou sangramento, 100% (12) apresentaram queixa de infertilidade associada à dor e/ou sangramento e 28,6% (02) apresentaram apenas queixa de infertilidade. Esta análise foi estatisticamente significativa (P= 0,003).

Tabela III - POR QUEIXA –Diferença entre as queixas das pacientes com endometriose: (DOR/SANGRAMENTO, INFERTILIDADE + DOR/SANGRAMENTO ou INFERTILIDADE) com os alelos avaliados. Goiânia, 2008.

QUEIXA	1(DOR /SANG.)		2 (INFER.+D/S)		3(INFERTILID.)		P
	%	n	%	n	%	n	
ARG/ARG	47,4	09	0,0	00	71,4	05	0,003
PRO/PRO OU PRO/ARG	52,6	10	100,0	12	28,6	02	0,003
TOTAL	100,0	19	100,0	12	100,0	07	

Na tabela IV foi feita uma correlação entre a intensidade da dor pélvica (leve/moderada ou intensa) com algumas variáveis. Com relação ao cruzamento efetuado entre a intensidade da dor com polimorfismo entre pacientes com arginina em homozigose (ARG/ARG), 76,5% (13) apresentaram dor leve/moderada e 4,8% (01), intensa. Com a presença da prolina em homozigose ou em heterozigose (PRO/PRO OU PRO/ARG), 23,5% (04 pacientes) apresentaram dor leve/moderada e 95,2% (20) apresentaram dor severa. Resultado estatisticamente significativo (P < 0,001 e O.R= 0,015 (0,003 a 0,222)).

Por outro lado, quando se correlacionou a intensidade da dor com a classificação proposta pela *American Fertility Society* (Anexo II) não houve significância estatística (P = 0,401 e O.R. = 1,750 (0,492 a 6,220) e ficou assim dividido: 50% (08 pacientes) com grau I ou II apresentaram dor leve/moderada e 36,4% (08 pacientes) apresentaram dor severa.

Também 50,0% (08 pacientes) com grau III ou IV apresentaram dor leve/moderada e 63,6% (14 pacientes) apresentaram dor severa (Tabela IV).

Tabela IV - POR INTENSIDADE DE DOR PELVICA – Diferença entre a intensidade da dor pélvica (LEVE/MODERADA ou INTENSA) com algumas variáveis em pacientes com endometriose. Goiânia, 2008.

DOR PELVICA	1(LEVE /MODER.)		2 (INTENSA)		P	OR	MÍN	MÁX
	%	n	%	n				
ARG/ARG	76,5	13	4,8	01				
PRO/PRO ou PRO/ARG	23,5	04	95,2	20	<0,01	0,015	0,003	0,222
TOTAL	100,0	17	100,0	21				
CLASSIFICAÇÃO								
1 (GRAU I/II)	50,0	08	36,4	08				
2 (GRAU III/IV)	50,0	08	63,6	14	0,401	1,750	0,492	6,220
ATIVIDADE FÍSICA								
1 (PRATICA)	61,1	11	55,0	11				
2 (NÃO PRATICA)	38,9	07	45,0	09	0,703	1,286	0,369	4,644
TOTAL	100,0	18	100,0	20				
RITMO SEXUAL								
1 (<= 2X/SEMANA)	38,9	07	35,0	07				
2 (>= 3X/SEMANA)	61,1	11	65,0	13	0,804	1,182	0,401	5,605
Total	100,0	18	100,0	100,0				

Teste qui-quadrado

Por outro lado, quando se correlacionou a intensidade da dor com a classificação proposta pela *American Fertility Society* (Anexo II) não houve significância estatística ($P = 0,401$ e $O.R. = 1,750$ (0,492 a 6,220) e ficou assim dividido: 50% (08 pacientes) com grau I ou II apresentaram dor leve/moderada e 36,4% (08 pacientes) apresentaram dor severa. Também 50,0% (08 pacientes) com grau III ou IV apresentaram dor leve/moderada e 63,6% (14 pacientes) apresentaram dor severa (Tabela IV).

A atividade física relacionada à intensidade da dor (Tabela IV) mostrou que 61,1% (11 pacientes) que praticavam atividade física regular apresentavam dor leve/moderada e 55,0% (11) apresentaram dor intensa. Entre as que não praticavam atividade física, 38,9%

(07) apresentavam dor leve/moderada e 45,0% (09) apresentavam dor intensa. Não foi estatisticamente significativa ($P = 0,401$ e $O.R. = 1,750$ (0,492 a 6,220)).

Cruzando intensidade da dor com o ritmo sexual (Tabela IV) foram encontradas 38,9% (07 pacientes) com frequência de até duas relações por semana com intensidade leve/moderada e 35,0% (07) com dor severa. As pacientes com frequência acima de duas relações por semanas se dividiram em 61,1% (11) com dor leve/moderada e 65,0% (13) com dor severa. Estes cruzamentos não foram estatisticamente significativos ($P = 0,804$ e $O.R. = 1,182$ (0,401 a 5,605)).

A Tabela V faz correlação entre a classificação do grau de endometriose (I/II ou III/IV) com variáveis estudadas.

Entre as 19 pacientes que apresentaram queixa de infertilidade, 43,7% (07) se enquadraram entre os graus I/ II e 54,5% (12) enquadraram-se entre III/IV.

Das pacientes férteis, 56,3% (09) estavam entre os graus I/ II e 45,5% (10) grau III/IV. Não estatisticamente significativo ($P = 0,511$ e $O.R. = 0,648$ (0,151 a 1,917)).

Entre as queixas principais, 58,8% (10 pacientes) classificam-se entre graus I/II e 42,8% (09 pacientes) grau III/ IV. 17,6% (03 pacientes) apresentaram queixa de infertilidade + dor/sangramento eram grau I/II e 38,2% (08) graus III/ IV. 23,5% (04 pacientes) com queixa de infertilidade apresentaram grau I/II e 19,0% (04 pacientes) grau III/IV. Não estatisticamente significativo ($P = 0,382$ e $O.R.=1,164$ (0,518 a 0,216)).

Com relação à periodicidade dos sintomas, 50,0% (08) das pacientes com queixa de dor ou sangramento no período peri-menstrual eram grau I/II e 40,9% (09 pacientes) grau III/IV. Também, 50,0% (08 pacientes) era grau I/II e 59,1% (13) grau III/IV. Essa análise também não foi estatisticamente significativa ($P = 0,578$ E $O.R. = 1,444$ (0,492 a 6,220)).

No que concerne a dor pélvica 50,0% (08 pacientes) com dor leve ou moderada era grau I/II e 40,9% (09 pacientes) grau III/IV. Entre as pacientes com queixas de dor intensa

47,1% (08) era grau I/ II e 60,9% (14), graus III/IV. Não estatisticamente significativo (P = 0,385 O.R. = 1,750 (0,492 a 6,220)).

Quando se avaliou o polimorfismo do códon 72 do gene *p53* destas pacientes, foram encontrados: 44,5% (08) pacientes com arginina em homozigoze (ARG/ARG) que apresentaram grau I/ II e 26,1% (06 pacientes) apresentaram grau III/IV. Das pacientes que apresentavam o alelo prolina em homozigoze ou heterozigoze (PRO/PRO ou PRO/ARG) 55,5% (10 pacientes) eram grau I/II e 73,9% (14 pacientes) eram grau III/IV. Não significativo estatisticamente (P = 0,357 O.R. = 1,867 (0,519 a 7,584)).

Tabela V- POR CLASSIFICAÇÃO- Diferença entre a classificação das pacientes com endometriose (GRAU I/II) ou (GRAU III ou IV) com as variáveis pesquisadas. Goiânia, 2008.

CLASSIFICAÇÃO	1 (I ou II)		2 (III ou IV)		P	OR	Mín.	Máx.
	%	n	%	n				
GRUPO								
1(INFERTILIDADE)	43,7	07	54,5	12	0,511	0,648	0,151	1,917
2(FÉRTIL)	56,3	09	45,5	10				
TOTAL	100,0	16	100,0	22				
QUEIXA PRINCIPAL								
1(DOR OU SANGR.)	58,8	10	42,8	09	0,382	1,164	0,518	0,216
2 (INFER. + DOR /SAN.)	17,6	03	38,2	08				
3(INFERTILIDADE)	23,5	04	19,0	04				
TOTAL	100,0	17	100,0	21				
DOR/SANG- período								
1 (PERI-MENSTRUAL)	50,0	08	40,9	09	0,578	1,444	0,492	6,220
2 (CICLO TODO)	50,0	08	59,1	13				
TOTAL	100,0	22	100,0	22				
DOR PÉLVICA								
1 (LEVE OU MOD.)	50,0	08	40,9	09	0,578	1,444	0,492	6,220
2 (INTENSA)	50,0	08	59,1	13				
TOTAL	100,0	16	100,0	22				
ARG/ARG	44,5	08	26,1	06	0,357	1,867	0,519	7,584
PRO/PRO ou PRO/ARG	55,5	10	73,9	14				
TOTAL	100,0	18	100,0	20				

Com cruzamento de dados entre o polimorfismo da *p53* e a ocorrência ou não de tratamento clínico complementar à cirurgia (Tabela VI). Foram 44,5% (08 pacientes) com

arginina em homozigose (ARG/ARG) que não necessitaram de tratamento clínico complementar e 30% (06 pacientes) que foram tratadas clinicamente.

As pacientes com alelo prolina em homozigose ou em heterozigose (PRO/PRO ou PRO/ARG) foram 55,5% (10) que não necessitaram de tratamento complementar e 70,0% (14) que necessitaram. Não estatisticamente significativo ($P = 0,357$).

Tabela VI- POR TRATAMENTO CLÍNICO ASSOCIADO – Diferença entre a prescrição de tratamento clínico posterior à cirurgia e os alelos estudados em grupo de pacientes com endometriose com ou sem infertilidade. Goiânia, 2008.

TRATAMENTO	1 (NÃO)		2 (SIM)		P
	%	N	%	n	
ARG/ARG	44,5	08	30,0	06	
PRO/PRO ou PRO/ARG	55,5	10	70,0	14	0,357
TOTAL	100,0	18	100,0	20	

Teste qui-quadrado

As variáveis estudadas nos dois grupos de pacientes foram agrupadas na tabela VII. Inicialmente, com relação à cor, foram encontrados 73,7% (14 pacientes) de cor branca no grupo I e 85,0% (17 pacientes) no grupo II, 26,3% (05 pacientes) de cor negra no grupo I e 10,5% (02 pacientes) de cor negra no grupo II ($P= 0,209$).

Na avaliação das queixas as pacientes foram divididas entre as que possuíam dor ou sangramento irregular foram 0,0% (00) grupo I e 100% (19 pacientes) no grupo II; as que possuíam queixas de infertilidade associado a sintomas de dor ou sangramento irregular foram 63,1% (12 pacientes) no grupo I e 0,0% (00) no grupo II, e as pacientes com queixa apenas de infertilidade foram 36,9% (07 pacientes) no grupo I e 0,0% (00) no grupo II.

Quanto a periodicidade dos sintomas foram encontradas 36,8% (07 pacientes) que apresentavam dor ou sangramento apenas no período peri-menstrual no grupo I e 52,6% (10 pacientes) no grupo II. Das pacientes apresentavam dor ou sangramento durante todo o ciclo, foram encontradas 63,2% (12 pacientes) no grupo I e 47,4% (09 pacientes) no grupo II ($P=0,328$).

Tabela VII – Correlação entre as variáveis estudadas e os grupos de pacientes com endometriose avaliadas: I (inférteis) e II (férteis). Goiânia, 2008.

VARIÁVEL	GRUPO I (INFÉRTEIS)		GRUPO II (FÉRTEIS)		p
	%	n	%	n	
COR:					
01- BRANCA	73,7	14	89,5	17	0,209
02- NEGRA	26,3	05	10,5	02	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
QUEIXA					
01-DOR OU SANGRAMENTO	0,0	00	100,0	19	-
02-INFERT.+ DOR/SANGRAM.	63,1	12	0,0	00	
03-INFERTILIDADE	36,9	07	0,0	00	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
PERIODICIDADE DOS SINTOMAS					
01-PERI-MENSTRUAL	63,2	12	47,4	09	0,328
02-CICLO TODO	100,0	19	100,0	19	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
INTENSIDADE DOS SINTOMAS					
01-LEVE / MODERADA	36,8	07	52,6	10	0,328
02-INTENSA	63,2	12	47,4	09	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
ATIVIDADE FÍSICA					
01-PRATICA	52,6	10	63,2	12	0,511
02-NÃO PRATICA	47,4	09	36,8	07	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
FUMO					
01-SIM	10,5	02	0,0	00	
02-NÃO	89,5	17	100,0	19	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
ALCOOL					
01-SIM	10,5	02	10,5	02	1,000
02-NÃO	89,5	17	89,5	17	
TOTAL	19	100,0	100,0	19	
ANTICONCEPCIONAL					
01-USA	0,0	00	63,2	12	-
02-NÃO USA	100,0	19	36,8	07	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	
RÍTMO SEXUAL					
01-(\leq 2X / SEMANA)	26,3	05	47,4	09	0,179
02-($>$ 2X / SEMANA)	73,7	14	52,6	10	
TOTAL	100,0	19	100,0	19	

Na avaliação da intensidade da dor, foram encontradas 35,8% (07 pacientes) com dor leve ou moderada no grupo I e 52,6% (10 pacientes) no grupo II. Foram encontradas 63,2% (12 pacientes) com dor intensa no grupo I e 50% (09) no grupo II (P= 0,328).

Com relação à atividade física, foram encontradas 52,6% (10 pacientes) que praticavam exercícios no grupo I e 63,2% (12) no grupo II; 47,4% (09) não praticavam exercícios no grupo I e 36,8% (07) no grupo II (P=0,511).

Com relação ao fumo, havia 10,5% (02 pacientes) fumantes no grupo I e 0,0% (00) grupo II. Havia 89,5% (17) não fumantes no grupo I e 100% (19) no grupo II.

Quanto ao uso do álcool, havia 02 (10,5%) pacientes que usavam álcool socialmente no grupo I e 10,5% (02) no grupo II; 89,5% (17 pacientes) não usavam álcool no grupo I e idem no grupo II (P= 1,000).

Quanto ao uso de contraceptivo, 0,0% (00) usava contraceptivo no grupo I e 63,2% (12) usavam no grupo II. Enquanto 100% (19 pacientes) não usavam no grupo I, 36,8% (07 pacientes) não usavam no grupo II.

Na avaliação do ritmo sexual, 26,3% (05 pacientes) mantinham um ritmo \leq de 02 relações por semana, enquanto 47,4% (09) informaram o mesmo ritmo no grupo II. 73,7% (14) no grupo I tinham mais que duas relações por semana e 52,6% (10) no grupo II tinham essa mesma frequência (P= 0,179).

6 – DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que pacientes com endometriose e com a presença do alelo prolina (em homozigoze ou heterozigoze) no codon 72 do gene *p53* apresentam queixas mais acentuadas (infertilidade associado à dor e/ou sangramento) ao contrário das pacientes com presença do alelo arginina em homozigoze (Tabela III).

Esses resultados vão de encontro ao relatado no trabalho de Hsieh e Lin (2006) que concluíram que a associação de endometriose e polimorfismo de *p53* existe e que o alelo arginina em homozigoze no códon 72 está relacionado com baixa suscetibilidade de desenvolvimento da doença e a presença do alelo prolina em dose dupla (PRO/PRO) ou apenas um alelo (PRO/ARG) está relacionada com suscetibilidade mais alta de desenvolvimento da doença e que o polimorfismo do *p53* no códon 72 pode se tornar um marcador útil para predizer o desenvolvimento da endometriose. O que também foi mostrado no trabalho de Chang (2002) em que o alelo prolina estaria relacionado a uma incidência de duas a três vezes maiores de desencadear a endometriose.

Foi detectada também uma maior porcentagem do alelo prolina nas pacientes com endometriose associado com manifestações clínicas mais severas (dor pélvica intensa e infertilidade), ou seja, a endometriose de prognóstico mais severo e de tratamento mais difícil. Assim, 95,5% (20 pacientes) com o alelo prolina apresentaram dor pélvica intensa. Este resultado é semelhante ao de Lattuada *et al.* (2004), que observou que nas pacientes que apresentaram casos mais severos de endometriose, o alelo prolina (PRO/PRO ou PRO/ARG) estaria presente (Tabela IV).

Por outro lado, a presença do alelo prolina (PRO/PRO ou PRO/ARG) não esteve associada aos graus III e IV da classificação laparoscópica da endometriose (Anexo II), que significa que os casos mais sintomáticos de endometriose (infertilidade associados a dor e/ou sangramento) não corresponderam com os graus de maior comprometimento

dados pela laparoscopia.

Outro estudo italiano realizado com mulheres caucasianas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas do polimorfismo do *p53* no códon 72 entre as pacientes com endometriose e as pacientes sem a doença sugerindo um papel secundário a esse polimorfismo em determinar suscetibilidade genética para endometriose (Ammendola *et al.*, 2007).

Em um estudo japonês os investigadores avaliaram somente casos com doença severa e nenhuma correlação foi encontrada (Omori *et al.*, 2004)

Uma importante questão a ser destacada seria o fato de que neste estudo não se correlacionou a presença do polimorfismo do códon 72 do gene *p53* entre pacientes com (grupo caso) e sem (grupo controle) endometriose, como foi feito em todos os trabalhos publicados. Neste estudo, a totalidade das pacientes possuía endometriose comprovada e a divisão dos grupos teve a intenção de diferenciar este polimorfismo entre aquelas que possuíam endometriose associado à infertilidade (grupo I) e aquelas que também possuíam endometriose, porém sem relato de dificuldade de gravidez (grupo II), o que o torna inédito.

Foi importante também tentar observar se esse polimorfismo do códon 72 do gene *p53* explicaria o porquê algumas pacientes com diagnóstico de endometriose e classificação laparoscópica de graus mais severos (III ou IV) eram férteis ou tinham sintomas clínicos leves da doença, enquanto outras com classificação laparoscópica de graus mais baixos (I ou II) eram inférteis ou tinham sintomas clínicos severos da doença. Isso ficou demonstrado quando da correlação entre a intensidade da dor pélvica (leve ou moderada e intensa) com a classificação proposta pela *American Fertility Society* (Anexo II) em que não foi demonstrada uma diferença significativa estatisticamente. Esses dados mostram que a classificação laparoscópica não se mostrou eficaz quando se tentou

estabelecer relação entre os sintomas clínicos das pacientes com os achados cirúrgicos, que vai de encontro aos dados mostrados por Bedone *et al.*(1994), quando correlacionou as manifestações clínicas e os achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica.

Ao correlacionar prática de atividade física e ritmo sexual com intensidade da dor havia a intenção, inicialmente, de se analisar se a dor intensa seria um fator incapacitante para a realização de ambos, o que não foi comprovado estatisticamente. Também não foi observado um fator protetor da atividade física em relação a intensidade da dor.

Existe relato da correlação entre o consumo de bebidas alcoólicas associado ao aumento da infertilidade de causa anovulatória e devido à endometriose (MartiniI, 2004). O uso de cinco doses diárias de álcool reduziria em 40% a chance de gravidez. No presente estudo 10,5% (4/38) das mulheres referiram uso de bebida alcoólica, mas todas com menos de cinco doses por dia. Enquanto 89,5% (34/38) afirmaram não ingerir bebidas alcoólicas.

O uso de anticoncepcionais por períodos prolongados têm o potencial de prevenir a endometriose por seu efeito bloqueador da produção de estrógenos, se constituindo numa das armas para o tratamento complementar (Tognotti *et al.*, 2003). Neste grupo de 38 pacientes, 31,6% faziam uso de anticoncepcional hormonal oral por períodos variados de 01 a 08 anos, contrariando o esperado.

A frequência de relações sexuais semanais pode sinalizar, naquelas com menos que duas relações por semana a dificuldade imposta pela dor causada pela endometriose ou até alterações psicológicas impostas pela doença (Fedele *et al.*, 1992). Nosso estudo observou que 36,8% das pacientes (grupos I e II) relataram no máximo duas relações por semana, não corroborando com essa hipótese.

A divisão dos pacientes em grupos: I inférteis e II férteis tiveram a importância de possibilitar investigar a intrigante questão do por que existem mulheres com endometriose

nos diversos graus de comprometimento que não apresentaram dificuldade para engravidar enquanto outras apresentam infertilidade.

Outra questão importante foi à possibilidade de se tentar investigar porque a sintomatologia da doença muitas vezes não condiz com o estágio da doença. Assim, é possível encontrar pacientes com grau III ou IV da doença sem sintomatologia severa e vice-versa.

Ao avaliar marcadores moleculares em dois grupos de pacientes com diagnóstico de endometriose, observou-se que o polimorfismo do códon 72 no seu exon 4 da proteína p53 conferiu susceptibilidade genética para a população estudada.

A presença do alelo prolina não foi estatisticamente significativa nos diferentes graus de classificação laparoscópica.

A classificação para endometriose, sobretudo quando se pensa em infertilidade e severidade dos sintomas das pacientes poderá ser mais fidedigna quando relacionada, também, com os achados genéticos como o do polimorfismo do gene p53 em seu códon 72.

Dessa forma, o polimorfismo da proteína p53 poderá ser usado como marcador molecular para endometriose associado a sintomas exacerbados e a infertilidade, podendo, portanto, ser um grande aliado no diagnóstico da doença, nortando o prognóstico e o tratamento da mesma.

7- CONCLUSÃO

A partir deste estudo conclui-se que o polimorfismo do gene *p53* correlaciona-se com a endometriose.

Observou-se também no presente estudo que o alelo prolina está aumentado nas pacientes com endometriose em relação à arginina.

Ao se correlacionar a presença dos alelos prolina e arginina com endometriose com e sem infertilidade conclui-se que a presença do alelo prolina está mais ligada à pacientes com infertilidade e com quadro clínico mais severo, ou seja, com dor pélvica intensa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO MS, PODGAEC S, MARTORELLI FILHO B. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12 (11): 2523-2527.

ABRÃO MS. Endometriose uma visão contemporânea. Editora Revinter. Rio de Janeiro, 2000.

ABREU LG. Atividade da aromatase em células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. *Rev Bras de Ginecol Obstet* 2005; 27(7): 434.

ACOSTA AA, SUELDO CE. Endometriosis / Infertilidad in: Remohi J; Simon; Pellicer, A; Bonilla, Em. (Eds): Reproducción Humana – Mcgraw – Hilal Interamericana de España Madrid 1996: 183.

ADAMSON GD. Laparoscopic treatments is better than medical treatment for minimal or mild endometriosis. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1996; 41 (4): 396-399.

ALDRIGHI TM. Endocrinologia Ginecológica, Aspectos Contemporâneos. Editora Ateneu. São Paulo, 2005: 221-228.

ALMEIDA JD. Expressão do gene p53 no carcinoma bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia, São José dos Campos*. 1999 ul/dez; 1 (1).

AMERICAN FERTILITY SOCIETY. Revised American Fertily Society Classification of Endometriosis. *Fertil Steril*. 1985; 43:351.

AMERICAN SOCIETY REPRODUCTIVE MEDICINE. Revised American Society for Reproductive Medicine. Classification of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997: 817-821.

AMMENDOLA M, BOTTINI FG, SESTI F, EMILIO P, BOTTINI E. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril*. 2008, Aug; 90(2): 406-408.

ARRIVE L, HRICAK H, MARTIN MC. Pelvic Endometriosis: MR imag *Radiol*. 1989; 171: 687-692.

ARVANITS DA, GOUMENOU AG, MATALLIOTAKIS IM, KOMANTAKIS EE, SPANDIDOS DA. Low penentrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*. 2001; 76:1202-1206.

BARANOVA H, BOTHRISHVILLI R, CANIS M, ALBUISSON E, LOWACZOWER E, BRUHAT MA, BARANOV V, MALET P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to Endomeetriosis in a French population. *Molecular Hum Reprod*. 1987; 3 (9) 775-780.

BEDONE AJ, MONTEIRO IMU, CANFOUR CC, RIBEIRO FILHO AD. Correlação entre as manifestações clínicas e os achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica. *Reprodução*. out/dez. 1994; 9 (4): 219-221.

BERGAMASCHI G, MERANTE S, ORLANDI E, GALLI A, BERNASCONI P, CAZZOLA M. TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematol*. 2004; 89 (7):868-869.

BERGQVIST A, FERNO M, MATTSON S. A comparison of cathepsin D levels in endometriotic tissue and in uterine endometrium. *Fertil Steril*. 1996; 65: 1130- 1134.

BRAUN DP, GEBEL H, ROTMAN C, RANA N, DMOWSKI WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1992; 57: 1203-1210.

BROOKES AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 23, (2): 177-186.

BROSENS I. Endometriosis: ovarian endometriosis. Tubal Infertility. Gower Medical Publishing. London, 1989 :313-317.

BROSENS I, WAMSTEKER K. Diagnostic imaging and endoscopy in gynecology. Saunders. London, 1997; 19: 313-317.

CARVALHO CV, D' AMOTA P, SATO H, GIRÃO MJBC, LIMA GR, SILVA IDG, SCHOR E. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose pélvica. *RBGO*. 2004; 26 (8).

CATALANO GF, MARANA R, CARUANA P. Laparoscopy versus microsurgery by laparotomy for excision of cysts in patients with moderate and severe endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparoscop*. 1996; 3: 267-270.

CAVALCANTI JÚNIOR GB, KLUMB CE, MAIA RC. P53 e as hemopatias malignas. *Rev Bras de Cancer*. 2002; 48 (3): 419-427.

CHACO K, ANDERSEN P, SCOMMEGNA A. The effect of peritoneal macrophage incubates on the spermatozoa assay. *Fertil Steril*. 1987; 48: 694.

CHANG CC, HSIEH YY, TSAI FJ, TSAI CH, TSAI HD, LIN CC. The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* . 2002; 77: 43-45.

CHATMAN DL. Endometriosis and the black women. *J Reprod Med*. 1976; 16: 303-306.

CRAMER DW, WILSON E, STILLMAN RJ, BERGER MJ, BELISLE S, SCHIFF I, ALBRECHT B, GIBSON M, SATADEL BV, SCHOOENBAUM SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. *J. Am. Med. Assoc*. 1986; 255: 1904-1908.

DE VIVO I, HANKINSON SE, COLDITZ GA, HUNTER DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res.* 2003; 63:5236-5238.

DMOWUSKI WP, LESNIEWICZ R, RANA N, PEPPING MP. Changing trends in the diagnosis of endometriosis: a comparative study of women with pelvic. *Fertil Steril.* 1987; Feb; 67(2): 238-243.

DONADIO N, NETO L C A. Consenso Brasileiro em Videoendoscopia Ginecológica. FEBRASGO, São Paulo 2001: 98-124.

DONALDSON CJ, CRAPANZANO JP, WATSON JC, LEVINE EA, BATZER MA. PROGINs Alu insertion and human genomic diversity. *Mutat.* 2002; 501:137-141.

DONNEZ J, NISOLE M, KARAMAN Y, WAYENBERGH M, BOURGONJON D, CLERCKX F, CASANAS-ROUX F. CO2 laser laparoscopy in peritoneal endometriosis and in ovarian endometrial cyst. *J. Ginecol Surg,* 1989; 5: 361-366.

DONNEZ J, CASANAS-ROUX F, NISOLE M. Peritoneal endometriosis: new histopathological aspects. In BROSERNS J DONNEZ J: The current status of endometriosis. New York, 1993: 75-87.

DONNEZ J, NISOLE M, SMOES P, GILLET N, BEGUIN S, CASANAROUX F. Peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril,* 1996; (3): 362-368.

FAKIH H, BAGGET B, HOLTZ G. INTERLEUKIN I. A possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril.* 1987; 47: 213.

FEDELLE L, ANCHI S, BOCCIOLONI L. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 1992; 79: 767-769.

FELIX CA, NAU MM, TAKAHASHI T. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Chin. Invest.* 1992; 89: 640-647.

FERNANDES MGM. MIB 1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV. *Rev Bras de Cancer.* 2002; 48, (1): 29-37.

FERREIRA M, GRATTAPAGLIA D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 1998; 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.

FERRERAS AM . Asociación entre la integración del virus del papiloma humano y la pérdida de heterozigosidad del gen p53 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinol. Esp.* 2001, 52: 546-552.

FLEISCHER AC, CULLINAN JA, WALSH JW. Problem-oriented gynecologic imaging with emphasis on ultrasonography. In FLEISCHER A C, MANNING F A, JEANTY P, ROMERO R (Ed); *Sonography in Obstet and Gynecol.* 1996; 5h Ed. Appleton e Lange:887.

GARAY HM. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. Rev. Biotecnol Ciên e Desenvol. jan/jun; 2003, 30.

GIORDANO MG. Ginecologia Endócrina e da Reprodução. Fundo Editorial BYC.1998: 225-244.

GREENHILL JP. The yearbook of obstetrics and gynecology. New York. 1942. The yearbook Publisher: 431.

GUIMARÃES P E M, COSTA M C R. Sutis diferenças de um código. Biotecnol Ciên e Desenvol, 2002; 26: 24-27.

HADFIELD R, MARDON H, BARLOW D, KENNEDY S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. Hum. Reprod 2006; 11(4):878-80,.

HAHN W, WEIBERG RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nature. 2002, 2: 231-341.

HALBAN J. Histeroadenosis metastática. Die linphogene Genese der sog. Adenofibromatosis heterotópica. Arch Gynäk. 1925; 124: 454 -482.

HALME J, HAMMOND MG, HULKA JF. Incidence of retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis. Obstet Gynecol. 1984; 64:151.

HALME J, BECKER S, HAMMOND M. Pelvic macrophages in normal and infertile women. Am J Obstet Gynecol. 1982; 142:890.

HASSON HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. J. Reprod. Med. 1976; 16: 135-138.

HEGG R, RIBEIRO RM, MELO NR, PINOTTI JA. Endometriose. RBM. 1993; 4: 114-31.

HSIEH YY, LIN CS. P53 codon 11,72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. Inter J Biol Sci 2006; 2: 188-193.

HONG YC, LEE KH, YI CH, HÁ EH, CHRISTIAN DC. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. Toxicol Left. 2002; 129: 255-262.

HOUSTON DE, NOLLER KL, MELTON LJ, SELWIN BJ. The epidemiology of pelvic endometriosis. Clin Obstet Gynecol. 1988; 31: 787-800.

JAVERT CT. Pathogeneses of endometriosis based on homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogeneous metastasis Cancer. 1949; 2:399-404.

KAUPILLA A. Changing concepts of medical treatment of endometriosis. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 1993; 72:324-336.

KIRSHON B, POINDEXTER AN, FAST J. Endometriosis in multiparous women. *J. Reprod Med.* 1989; 34:215-17.

KLUMB CE, JÚNIOR GBC. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev. Brasil de hematol/hemot.* 2002; 24(2):111-125.

KOJIMA E, MORITA M, OTAKA K. YAG laser laparoscopy for ovarian endometriomas. *J Reprod Med.* 1990; 35: 592-596.

KONINCKX PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 1992; 58 : 290-295.

KUPFER MC, SCHWIMER SR, LEBOVIC T. Transvaginal sonography appearance of endometrioma: spectrum of findings. *J. Ultrassound Med.* 1992; 11: 29-133.

KURJAK A, KUPESIC S. Scoring system for prediction of ovarian endometriosis based on transvaginal color and pulsed Doppler sonography. *Fertil Steril.* 1994; 62: 81-88.

KURZ C, TEMPFER CB, BOECKSKOER S, UNFRIED G, NAGELE F, HEFLER LA. The PROGINS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage. *J. Soc. Gynecol Investig.* 2004; 8:295-298.

KWOK PY, GU Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today* 1999; 5: 538-543.

LANE DP, CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV-40 transformed cells. *Nature*, 1979; 278: 261-263.

LATTUADA D, VIGANO P, SOMIGLIANA E. ABBIATI M, BLASIO AMD. Analysis of the códon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients with endometriosis. *Molecular Hum Reprod.* 2004; 10(9): 651-654.

LEVINE AJ MOMAND J. Tumor supressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Bioch. et Bioph. Acta.* 1990; 1032: 119-136.

LEVINE A J, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour supressor gene. *Nature.* 1991; 351: 453-456.

LINHARES JJ, SILVA IDG, NOGUEIRA N, NORONHA EC, FERRARO O , BARACAT, EC, FARAH F. Polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controle. *Rev.Bras. Ginecol. Obstet.* 2005; 27 (8):473-478.

MARTINII AC. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fert Steril* 2004; aug;82(2):374-377.

- MATHIAS SD, KEPPERMAN M, LIBERMAN RF, LIPSCHUTZ RC, STEEGE JF. Chronic pelvic pain: prevalence, health-related quality of life, and economic correlates. *Obstet. Gynecol.* 1996; 87 (3): 321-327.
- MATHIS BV, MILLER JS, LUKENS ML, PALUZZI MW. Pelvic congestion syndrome: a new approach to an unusual problem. *Am Surg* 1995; 61: 1016-1018.
- MATORRAS R, RODRIQUEZ F, PIJUAN JI, RAMÓN, O GUTIERREZ DE TERÁN G, RODRIGUES-ESCUADERO F. Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril.*1995; 63:34-38.
- MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES DS, SMITH SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum. Reprod.*1996; 11 : 220-223.
- METZGER DA, HANEY AF. Etiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.*1989; 16:1-14.
- MEYER R. Ueber den Study der Frage der Adenomyosites Adenomyoma in Allgemeinem und Adenomyonetites Sarcomatosa . *Zentralbl Gynakol.* 1919; 36: 745- 759.
- MIAZAWA K. Incidence of endometriosis among Japanese women. *Obstet Gynecol.*1976; 48: 407-409.
- MOEN MH e MAGNUS P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1993,72: 560-564.
- MOEN MH, SCHEI B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian country. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997; 76(6): 559-562.
- MOURA MD, PEREIRA TN, NOGUEIRA AA, FERRIANI RA, SALA RMR. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. Evolutionary clinical treatment of Endometriosis. *Rev. Brasil. Ginecol. e Obstet.*1999; 21(4): 227-232.
- MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA, DE MAYO FJ, LYDON, CONNEELY OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* 2000; 289:1751-1754.
- MUZII L, MARANA R, BRUNETTI L. Atypical endometriosis revisited: clinical and biochemical evaluation of the different forms of superficial implants. *Fertil Steril.* 2000; 74 (4):739-742.
- NAKATA LC, BERTOLLO EMG, SANTOS I, OLUANI AH, VAZ DCM, OLIVEIRA GH, BERTELLI ECP. Biomarcadores de Suscetibilidade à Endometriose. *RBGO.* 2004; 26(4):299-304.

NEZHAT F, NEZHAT C, ALLAN CJ, METZGER DA, SEARS DL. A clinical and histological classification of endometriomas: implications for a mechanism of pathogenesis. *J. Reprod Med.*1992; 37: 771-776.

NISSOLE M, PAINDAVEINE B, BOURDIN A, BERLIERE M, CASANAS, ROUX F; DONNEZ J. Histological study of peritoneal endometriosis in infertile women. *Fertil Steril.* 1990; 53: 948.

NISOLLE M, CASANAS-ROUX F, ANA FV, MINE JM, DONNEZ J. Peritoneal endometriosis: evaluation of typical and subtle lesions. In DONNEZ J, NOSOLLE M, EDITOR. *Laser operative laparoscopy and hysteroscopy.* New York: Phatheon, 1994:5-39.

NISOLLE M, DONNEZ J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril.*1997; 68: 585-596.

NYLANDER K, DABEISTEEN E, HALL PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Patol Med.* 2000; 29: 413-425.

OMORI S, YOSHIDA S, KENNEDY SH, NEGRO K, HAMANA S, BARLOW DH, MARUO T. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene is not associated with endometriosis in a Japanese population. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:232–236.

OSBORNE RJ, HAMSHERE MG. A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 3706-3712.

OZAWA Y. Management of the pain associated with endometriosis: na update of the painful problemns. *Tohoku J. Exp. Med.* 2006; 210: 175-188.

PARAZZINI F, LA VECHIA C, FRANCESCHI S, NEGRI E, CECCHETTI G. Risk factors for endometrioid, mucinous and serous benign ovarian cysts. *Int J. Epidemiol.*1989; 18:108-112.

RANNEY B. Endometriosis: pathogenesis, symptoms and findings. *Clin. Obstet. Gynecol.*1980; 23:865-874.

REESE KA, REDDY S, ROCK JA. Endometriosis in an adolescent population: the Emory experience. *J. Pediatr Adolesc Gynecol.*1986; 9(3): 125-128.

REICH H, MCGLYNN F, SALVAT J. Laparoscopic treatment of culde-sac obliteration secondary to retrocervical deep fibrotic endometriosis. *J Reprod Med,* 1991; 36(7): 516-522.

RIVOIRE WA. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Cancer.* 2001, 47, (2): 179-184.

RODRIGUES DE LIMA G, BARACAT EC. *Ginecologia Endócrina.* Atheneu, São Paulo. 1995.

ROSSIT A, CONFORTI, FROES ND. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. Rev. Soc. Bras. Cancer. 2000; 3: 26-30.

ROWE SM, COUGHLAN SJ, MCKENNA NJ. Ovarian carcinoma-associated Taq restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. Cancer Res. 1995; 55:2743-2745.

RUSSEL WW. Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary – Ovarian cysts of Müllerian origin. Bull John Hopkins Hosp. 1989; 10: 8-10.

SAMPSON JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol. 1927; 14: 422-469.

SANGI-HAGHPEYKAR H, POINDEXTER NA. Epidemiology of endometriosis among porous women. 35th ed. Obstet Gynecol. 1995; 85 (6): 983-992.

SILVA JM, DOMINGUEZ G, GARCIA JM, CANTOS B, RODRIGUES R, LARRONDO., PROVENCIO M. ESPAÑA. BONILLA F. Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. The J Pathol. 2003; 199: 289-297.

STOREY A, THOMAS M, KALITA A, HARWOOD C, GARDIOL D, MANTOVANI F, BREUER J, LEIGH IM, MATLASHEWSKI G, BANKS L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma virus-associated cancer. Nature. 1998; 393:229-234.

STRATHY JH. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. Fertil. Steril, 1982; 38 (6):66772.

STRIPLING MC, MARTIN DC, CHATMAN DL, VANDER ZWAAY R, PONSTON WN. Subtle appearance of pelvic endometriosis. Fertil Steril. 1988; 49:427.

SUTCLIFFE JE, BREHM A. Of flies and men; p53, a tumor suppressor. FEBS Letters. 2003; 567: 86-91.

THOMAS EJ. Endometriosis – confusion or sense? Int, J. Ginecol. \obstet. 1995; 48 (2) 149-155.

VELEBIL P, WINGO PA, XIA Z, WILCOX LS, PETERSON HB. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. Obstet. Gynecol.1995; 86 (5):764-769.

VIGANO P, VERCELLINI P, DI BLASIO AM, COLOMBO A, CANDIANI GB, VIGNALI M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. Fertil Steril. 1991; 56: 894-899.

WHEELER JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. J Reprod Med 1989;34 (1):41-46.

WIESER F, SCHENEEBERGER C, TONG D, TEMPFER C, HUBER JC, WENZL R.
PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometrioses. *Fertil Steril.*
2002; 77:309-312.

ANEXOS

Anexo I - TABELA VIII – CLASSIFICAÇÃO DA ENDOMETRIOSE

Anexo II- TABELA IX. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS AFETADOS PELA ENDOMETRIOSE

Anexo III- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Anexo IV- CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Anexo V- QUESTIONÁRIO - ANÁLISE MOLECULAR EM UM ESTUDO PROSPECTIVO LONGITUDINAL DUPLO-CEGO REALIZADO COM PACIENTES COM CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE

Anexo VI- ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA GMR (QUALIS A/ CBI).

ANEXO I

Tabela VIII – Classificação laparoscópica da endometriose

Endometriose leve
-Lesões recentes, dispersas (implantes não associados a cicatrizes ou retrações do peritônio) no fundo-de-saco anterior, posterior ou no peritônio pélvico
-Raros implantes na superfície do ovário, sem endometrioma, sem cicatriz superficial ou retração
- Sem aderências periovarianas
- Sem aderências peritubáricas

Endometriose moderada
-Endometriose envolvendo um ou ambos os ovários com grandes lesões superficiais, com cicatriz e retração ou pequenos endometriomas
- Aderências periovarianas mínimas associadas a lesões ovarianas
- Aderências peritubáricas mínimas associadas a lesões ovarianas
- Implantações superficiais no fundo-de-saco anterior ou posterior, ou ambos, com cicatriz e retração. Algumas aderências, porém sem invasão de sigmóide

Endometriose severa
-Endometriose envolvendo um ou ambos os ovários com endometriomas maiores que 2 x 2cm
-Um ou ambos os ovários envolvidos inferiormente por aderências associadas à endometriose, com ou sem aderências tubáricas aos ovários
-Uma ou ambas as trompas as envolvidas inferiormente ou obstruídas por endometriose, associadas com aderências ou lesões
-Obliteração do fundo-de-saco de Douglas por aderências ou lesões associadas com endometriose
-Espessamento dos ligamentos uterossacros e lesões do fundo-de-saco de Douglas por endometriose invasora com obliteração deste
-Acometimento significativo do intestino ou das vias urinárias.

(Fonte: Giordano, 1998).

ANEXO II

Tabela IX. Descrição laparoscópica dos locais afetados pela endometriose

Peritônio

Endometriose	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
Superficial	1	2	4
Profunda	2	4	6

Ovário

D superficial	1	2	4
Profunda	4	16	20
E superficial	1	2	4
Profunda	4	16	20

Obliteração do fundo-de-saco

Parcial: 4 Completa: 40

Ovário

Aderências	<1/3	1/3-2/3	>2/3
D discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
E discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16

Trompa

D discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
E discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16

Estadio I (mínimo) – 1 a 5 pontos, Estadio II (leve) – 6 a 15 pontos, Estadio III (moderado) – 16 a 40 pontos, Estadio IV (severo) - > 40 pontos

(FONTE: Giordano 1998).

ANEXO III

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, de uma pesquisa científica. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelo telefone 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do projeto: ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *P53* EM PACIENTES COM CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE ASSOCIADO À INFERTILIDADE.

Coordenador responsável: Dra Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Telefones para contato: 39467-1385 e 3946-1442

Eu, abaixo qualificado, após ter sido esclarecida verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: Análise molecular em um estudo prospectivo longitudinal duplo-cego realizado em pacientes com clínica de endometriose realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás.

DECLARO assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente que o trabalho consiste na análise molecular de amostras de sangue, citologia e biópsia, e que os mesmos serão utilizados em exames correlacionados mantendo o objetivo de complementar o meu diagnóstico.

DECLARO que compreendi que a obtenção das amostras citadas acontecerá sob minha total ciência, e sob os procedimentos adequados pela equipe responsável pela pesquisa, sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

Outrossim, tenho pleno conhecimento de que o material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa.

- Nome do pesquisador:

- Assinatura da paciente

- Data: ____/____/____

ANEXO IV

PRÓ-REITORIA DE POS GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG
Nº _____, CPF Nº _____, prontuário Nº:
_____, No da matrícula: _____, abaixo assinado, concordo
em participar no projeto: **ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE P53 EM
PACIENTES COM CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE ASSOCIADO À
INFERTILIDADE**, como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida pelo
pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim como os possíveis
riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar
meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou
interrupção de meu acompanhamento / assistência / tratamento.

Local e data: _____

Pesquisador: _____

Nome do sujeito ou responsável: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e
aceite do sujeito em participar**

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO V

QUESTIONÁRIO - ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE *P53* EM PACIENTES COM CLÍNICA DE ENDOMETRIOSE ASSOCIADO À INFERTILIDADE.

-Nome:

-Data de nascimento: / / . – Cor de pele:

-Endereço:

-Telefones:

-Queixa principal:

- Demais sintomas:

- Duração:

- Período do ciclo: ciclo todo () ; dor do meio do ciclo () ; dor pré-menstrual ()

- Infertilidade: não (grupo II) () ; sim (grupo I) () primária () secundária ()

- Hábitos de vida:

→ Atividade física: leve () moderada () intensa ()

→ Fumo () álcool ()

→ Uso de Anticoncepcional: não () sim().

➤ Há quanto tempo.....

➤ Qual esquema.....

➤ Ocorre melhora da dor com ACO: não() ; sim e parcial();melhora completa().

- Ritmo sexual: () vezes por semana.

- História Obstétrica: gesta() para() aborto() cesariana () .

- Idade dos filhos:

ANEXO VI



Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2009.

Prezada Profa. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura,


Acusamos o recebimento do artigo **“Endometriosis is associated with the proline allele and linked to women with infertility and more severe clinical”**, para possível publicação na revista *Genetics and Molecular Research* (GMR).

O número de controle do trabalho é GMR 593. Por favor, utilize esse número para futuras correspondências.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da revista através do **pagamento da taxa de publicação (R\$ 700,00)**, caso o trabalho seja aceito.

Ratificamos que a GMR está indexada em 64 base de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI.

Atenciosamente,



Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

ENDOMETRIOSIS IS ASSOCIATED WITH THE PROLINE ALLELE AND LINKED TO WOMEN WITH INFERTILITY AND MORE SEVERE CLINICAL

Circoncisto Laurentino Ribeiro Júnior^{1,2}; Jalsi Tacon Arruda³; Constanza Thaise Xavier Silva³; Hayllane de Oliveira Nascimento³; Katia Karina Verolli de Oliveira Moura^{2,3}

¹Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana – FÉRTILE, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Mestrado em Genética – MGene, Goiânia, Goiás, Brasil.

³Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon, Goiânia, Goiás, Brasil.

Correspondence should be addressed to:

Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Telephone number: +55-62-3946-1385

Fax number: +55-62-3946-1443

E-mail:kkverolli@ucg.br, katiakarina@yahoo.com.br;

Conflict of interest statement: none.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the frequency of p53 polymorphism codon 72, in two groups of patients with endometriosis and other symptoms of the disease. The study included 38 peripheral blood samples from women submitted to videolaparoscopy that confirmed endometriosis. The patients were divided into two groups of 19 women each, one with infertility and the other not. The polymorphism was evaluated by PCR. The data were submitted to statistical analysis using the chi-square and odds ratio tests. Of the patients who only had pain and/or bleeding without infertility, 09 (47.3%) were arginine homozygous and 10 (52.6%) were proline homozygote or heterozygote. Of those who presented with infertility associated with pain and/or bleeding, 12 (100%) were proline homozygous or heterozygous, and in those with only complaint of infertility, 05 (71.4%) were arginine homozygous and 02 (28.6%) proline homozygous or heterozygous. In correlating pain intensity, 04 (23.5%) women with the proline allele (homozygous or heterozygous) reported slight or moderate pain and 20 (95.5%) intense pain. All these differences were statistically significant ($p= 0.003$). In relating pain intensity to laparoscopic classification, the following was found: 08 (50%) patients who showed slight or moderate pain had a classification I or II and 08 (50%) III or IV. Of those with intense pelvic pain, 08 (36.4%) were included in classification I or II and 14 (63.6%) in III or IV. The proline allele (homozygous or heterozygous) is linked more to patients with infertility and with a more severe clinical picture.

Key words: p53, endometriosis, codon 72 polymorphism.

INTRODUCTION

Endometriosis is a polygenic/multifactorial disease that is characterized by the growth of foci of endometrial tissue outside the uterine cavity and that frequently results in various gynecologic problems, including dyspareunia, dysmenorrhea, pelvic pain and infertility (Bischoff and Simpson, 2000). Although approximately 18% of women of childbearing age develop the disease (Wieser et al., 2002), its etiology still remains obscure. The theory of retrograde menstruation has been widely utilized to explain its origin. This theory proposes that during reflux of menstrual fluid, viable endometrial cells are shed in menstruation and reach the peritoneal cavity via the uterine tubes, with consequent implantation and local growth, since peritoneal macrophages of patients with endometriosis are not capable of efficiently phagocytizing the peritoneal reflux (Santanam et al., 2003; Seli et al., 2003).

Various studies have demonstrated a familial tendency for the occurrence of endometriosis (Reis et al., 2004), which in association with the interaction of multiple genes as well as environmental factors determines the appearance of the disease (Bischoff et al., 2000). Endometriosis exhibits characteristics similar to those of malignancy, such as local invasion and aggressive spreading to distant organs. Its monoclonal origin indicates a neoplastic and genetic nature in the majority of endometrial lesions (Nakayama et al., 2001). Genomic alterations can represent important events in the development of endometriosis. Tumor suppressor genes act in the regulation of cell growth and in the prevention of carcinogenesis. Alterations in tumor suppressor genes could be related to the development of endometriosis (Jiang et al., 1996).

The p53 is a representative tumor suppressor gene, controlling DNA transcription and the regulation of the cell cycle, where it is involved in cell proliferation as well as the progression of various types of tumors. It is located on chromosome 17p13, and induces apoptosis or blocks the cell cycle in response to DNA damage, making it possible for cells to be destroyed or repaired before re-initiation of DNA replication (Robles and Harris, 2002). Mutations of this gene are associated with instability in cell development and progression of the cell cycle (Robles and Harris, 2002). Numerous cancers are associated with somatic abnormalities of the p53 gene, including cancers of the colon, ovary, nasal cavity, throat, esophagus and lung and lymphomas (Hollstein et al., 1991). On the other hand, germline variants of the p53 gene are less known, and there are controversies over their importance in various tumors (Storey et al., 1998; Zehbe et al., 2001; Koushik et al., 2004).

More specifically, two variants of common polymorphisms were described in codon 72 of the p53 gene (Storey et al., 1998; Zehbe et al., 2001; Robles et al., 2002; Zhang et al., 2004). This polymorphism derives from the substitution of a single nucleotide in codon 72, resulting in the presence of proline (p53pro) or arginine (p53arg) in the protein product. Some studies have reported the arginine homozygote in codon 72 of p53 protein as being a risk factor for the development of cancer (Storey et al., 1998). Other investigators did not demonstrate an association between different types of polymorphism and the development of individuals' cancer (Helland et al., 1988), while others revealed elevated risk in individuals with the proline homozygous genotype in codon 72 of p53 protein (Wang et al., 1999; Yu et al., 1999).

Studies have demonstrated the biochemical and functional properties of this polymorphism in codon 72. The proline form of p53 is a stronger activator of transcription but a poor activator of apoptosis, compared to the arginine form (Robles et al., 2002).

A high deletion frequency of locus 17p13.1 of p53 has been found in endometriosis (Bischoff, 2002). Abnormalities and chromosomal aberrations related to p53 can be associated with the malignant transformation of ovarian endometriosis (Mhaweck et al., 2002). On the other hand, some investigators did not detect altered expression of p53 in endometriosis (Vercellini et al., 1994; Horiuchi et al., 1998; Schneider et al., 1998).

In correlating p53 polymorphism with endometriosis, Hsieh and Lin (2006) concluded that an association existed in the locus 17p13.1. According to these authors, the arginine homozygous genotype in codon 72 is related to low susceptibility for developing endometriosis, while the proline homozygous or heterozygous allele in p53 codon 72 is related to higher susceptibility of developing the disease. They therefore concluded that p53 polymorphism in codon 72 can be a useful marker for predicting the development of endometriosis (Hsieh and Lin, 2006).

Lattuada et al. (2004) analyzed the polymorphism of p53 codon 72 in patients with endometriosis, and the results did not demonstrate a genetic susceptibility for endometriosis, but there was an increased incidence of proline in the more severe forms of the disease. In another work, conducted by Chang et al. (2002), an association between the proline form (homozygous or heterozygous) in p53 codon 72 polymorphism and endometriosis was demonstrated.

The aim of the present study was to evaluate the polymorphism of the p53 gene in codon 72 in two groups of patients with a diagnosis of endometriosis, where one of the groups was diagnosed with infertility and the other not. It was our intention to also determine the frequency of p53 polymorphism in the two groups and to correlate the presence of the proline allele with infertility and other clinical symptoms of endometriosis.

MATERIALS AND METHODS

The study included 38 peripheral blood samples of patients between 25 and 35 years from a reference center for videolaparoscopy and infertility in Goiania, Brazil (FERTILE) with signs and symptoms suggestive of endometriosis, who were submitted to videolaparoscopy for clarification of diagnosis and treatment (Hasson, 1976). All patients had a diagnosis of endometriosis confirmed by a pathologist (Nezhat et al., 1992). The patients answered a questionnaire on personal information and social habits (Matorras et al., 1995) and were divided into two groups of 19 each. The first group comprised women who complained of infertility and who had intentions of pregnancy with a history of trying for at least one year. The women in the second group already had children without any difficulties or assisted reproduction (Kirshon et al., 1989), but they had other complaints or an ultrasound examination suggesting endometriosis. On videolaparoscopy, the patients were classified with regard to the degree of endometriosis, based on the criteria defined by the American Fertility Society in 1985 and revised in 1996 by the then called American Society for Reproductive Medicine: grade I (minimal), grade II (slight), grade III (moderate), grade IV (severe) and based on a tubal patency test, where the injection of methylene blue makes it possible to determine if there is permeability of the Fallopian tubes (Mol et al., 1999).

The exclusion criteria were: patients submitted to salpingectomy (tubal factor); partner with two abnormal semen analysis (male factor); persistent anovulation diagnosed by ultrasound (ovarian factor), and abnormal post-coitus test (cervical factor).

Molecular analysis

DNA was extracted from the patient samples according to the instructions of the GFX protocol (Amersham, USA) for whole blood. The DNA samples were amplified by PCR

for the detection of the p53 polymorphism in codon 72, based on the technique described by Miller (1988).

The internal control used for human DNA was the primer ZFX/ZFY which amplifies specific sequences of the sex chromosomes, and all analyses were carried out in duplicate (Table I). The product obtained for each reaction was submitted to 2% agarose gel electrophoresis for p53, in an electric field of 10 v/cm, and stained with ethidium bromide (5µg/ml), and the image of the gel was recorded with the help of a video-documentation system (Image Master VDS - Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Statistical analysis

The means and standard deviation were calculated for the variables relative to the patients and the clinic-pathological aspects. The chi-square and odds ratio tests were utilized for the determination of possible associations between molecular analysis and clinical and histopathological data. The Bio Stat 3.0 program was used to carry out the statistical tests.

RESULTS

In correlating the complaint of the patient (pain and/or bleeding, infertility + pain and/or bleeding or infertility) with the alleles examined (arginine homozygous, and proline heterozygous and homozygous), the 09 (47.3%) patients with a complaint of pain and/or bleeding were arginine homozygous and 10 (52.6%) were proline homozygous or heterozygous. Of the patients who showed infertility combined with pain and/or bleeding, 12 (100%) were proline homozygous or heterozygous, and in those with only complaint of infertility (without pain and/or bleeding, 05 (71.4%) were arginine homozygous and 02 (28.6%) were proline homozygous or heterozygous, where the results were significant ($P=0.003$).

A correlation analysis was performed between pelvic pain intensity (slight/moderate or intense) and some variables. In relation to this analysis between pain intensity and polymorphism, there were 13 (76.5%) patients with the arginine homozygous genotype, who had slight or moderate pain and 01 (4.8%) with severe pain. With the presence of the proline genotype, homozygous or heterozygous, 04 (23.5%) patients showed slight or moderate pain and 20 (95.2%) had severe pain. The results were statistically significant ($P<0.001$ and $OR=0.024$ (CI 95% 0.003 to 0.222)).

On the other hand, when pain intensity was correlated with the classification proposed by the American Fertility Society, there was no statistical significance ($P=0.387$ and $OR=1.750$ (CI 95% 0.492 to 6.220): 08 (50%) patients with grade I or II showed slight or moderate pain, and 08 (36.4%) patients had severe pain. Also, 08 (50%) patients with grade III or IV showed slight or moderate pain and 14 (63.6%) patients had severe pain.

DISCUSSION

Our study showed that the presence of the proline allele (homozygous or heterozygous) of the p53 gene in codon 72 is related more to substantial complaints (infertility associated with pain and/or bleeding), in contrast to patients who showed the arginine homozygous genotype, and that the presence of the proline allele is more prevalent in endometriosis.

These findings are at odds with those reported by Hsieh and Lin (2006) who concluded that: there is an association between endometriosis and p53 polymorphism; the arginine homozygous genotype in codon 72 is related to low susceptibility of developing endometriosis; the proline homozygous or heterozygous genotype in codon 72 of p53 is

related to a higher susceptibility of developing endometriosis; and p53 codon 72 polymorphism can be a useful maker for predicting the development of endometriosis. The results also corroborate the results of Chang et al. (2002) who found that the proline allele is related to a two to three times greater chance of leading to endometriosis.

It was also observed that there was a greater incidence of the proline allele (homozygote or heterozygote) in the more severe cases of endometriosis (pelvic pain associated with infertility), that is, endometriosis of more severe prognosis and more difficult to treat. Therefore, 21 patients (95.5%) with the proline genotype (homozygous or heterozygous) had intense pelvic pain. This result corroborates the work of Lattuada et al. (2004) who observed that in the patients whose cases of endometriosis were the most severe, the proline genotype (homozygous or heterozygous) was present.

On the other hand, the presence of the proline allele (homozygous or heterozygous) was not associated with endometriosis of laparoscopic grades III and IV, as would be expected. The association between p53 polymorphism at codon 72 and endometriosis has been described with different forms of evidence. Chang et al. (2002) showed that the arginine homozygous allele is related to a lower risk of endometriosis, whereas the proline homozygous or heterozygous allele is related to a higher risk, suggesting that the p53 genotype could be a predictive marker of the disease. There are studies that contradict this finding, suggesting that p53 polymorphism does not confer susceptibility for endometriosis. In a Japanese study, the investigators evaluated only cases with severe disease and no correlation was found (referencia). An Italian study (Lattuada et al., 2004) demonstrated, by means of a statistical correlation, an inclination for an increased frequency of the proline allele in more severe forms of the disease, suggesting a possible role for this polymorphism in the development of more severe forms of the disease. In another Italian study (Ammendola et al., 2008) conducted in white women, no statistically significant differences were found regarding the p53 codon 72 polymorphism between patients with endometriosis and patients without the disease, suggesting a secondary role for this polymorphism in determining genetic susceptibility for endometriosis, contrary to findings of other studies, such as in a Chinese population.

An ethnic difference in the frequency of the proline allele between populations can explain these differing results. A work carried out by Pergoraro et al. (2002) exemplified the importance of ethnicity, as they related the presence of the arginine homozygous genotype with an increased incidence of cancer in a population of blacks in South Africa.

In a Brazilian study, the influence of ethnicity is complicated by the fact that our population is miscegenated, and many investigators report white skin color as a phenotype, but the genotype is often not congruous with this phenotype. Therefore, Pena et al. (2000) discussed the difficulty in our country of correlating any findings with ethnicity and the matter that factors such as socio-economic ones could influence the results presented. Since the patients in the present study were from a private clinic, a socio-economic factor could have influenced the results.

An important question that should be pointed out is the fact that in this work the presence of p53 codon 72 polymorphism was not correlated between patients with (case group) and without (control group) endometriosis, as done in other reported studies. In the present work, all patients had proven endometriosis and the division into two groups was intended to differentiate this polymorphism between women who had endometriosis associated with infertility (group I) and those who had endometriosis but no reported difficulty in getting pregnant (group II), which has not been previously published. It was also important to see if this p53 polymorphism at codon 72 explains why some patients with a diagnosis of endometriosis and laparoscopic classification of more severe grades (III or IV) were fertile

or had slight clinical symptoms of the disease, while others with a laparoscopic classification of lower grades (I or II) were infertile or had more severe clinical symptoms of the disease.

Conclusion

The presence of the proline allele is linked more to patients with infertility and with a more severe clinical picture, that is, with more substantial pelvic pain.

The presence of the proline allele did not show statistically significant differences in laparoscopic classification grades.

The p53 polymorphism could be used as a molecular marker for endometriosis associated with exacerbated symptoms and infertility, and therefore as great aid in the diagnosis of endometriosis, guiding prognosis and treatment of this disease.

Acknowledgements

CL Ribeiro Júnior and JT Arruda contributed equally to this work. Research supported by Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brazil (UCG/PROPE/MGene). We are grateful to the Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana – FÉRTILE for allowing us to conduct this research and for support. JT Arruda was granted a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship.

REFERENCES

- American Fertility Society. Revised American Fertility Society. (1985). Classification of Endometriosis. *Fertil Steril*. 43:351.
- American Society Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine. (1997). Classification of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 817-821.
- Ammendola M, Bottini FG, Sesti F, Piccione E, et al. (2008). Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril*. 90(2): 406-408.
- Bedone AJ, Monteiro IMU, Canfour CC, Ribeiro Filho AD. (1994). Correlation between clinical manifestations and found laparoscopy findings and patients with pelvic endometriosis. *Reproduction*. 9(4): 219-221.
- Bischoff FZ, Heard M, Simpson JL. (2002). Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis. *J Reprod Immunol*. 55:49-64.
- Bischoff FZ, Simpson JL. (2000). Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update*. 6:37-44.
- Chang CC, Hsieh YY, Tsai CH, Tsai HD and Lin CC. (2002). The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril* 77, 43-45.
- Hasson, HM (1976). Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J. Reprod Med*. 16:135-138.
- Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO et al. (1998). P53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 396:530-1.

- Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B and Harris CC. (1991). P53 mutations in human cancers. *Science*. 253, 49-53.
- Horiuchi A, Osada R, Nakayama K, Toki T et al. (1998). Ovarian yolk sac tumor with endometrioid carcinoma arising from endometriosis in a postmenopausal woman, with special reference to expression of alpha-fetoprotein, sex steroid receptors, and p53. *Gynecol Oncol* 70: 295-9.
- Hsieh YY, Lin CS. (2006). P53 codon 11, 72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. *Int J Biol Sci*. 2(4): 188-193.
- Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, Watson RH et al. (1996). Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer. Res* 56:3534-9.
- Kirshon B, Poindexter NA, Fast J. (1989). Endometriosis in multiparous women. *J. Reprod Med* 34: 215-217.
- Koushik A, Platt RW and Flanco EL. (2004). P53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*. 13, 1-22.
- Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Abbiati A et al. (2004). Analysis of the codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients with endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. vol.10, n°9pp 651-654.
- Matorras R, Rodriguez F, Pijuan JI, Ramón O et al. (1995). Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril*. 63:34-38.
- Mhawech P, Kinkel K, Vlastos G, Pelte MF. (2002). Ovarian carcinomas in endometriosis: an immunohistochemical and comparative genomic hybridization study. *Int J Gynecol Pathol*. 21: 401-6.
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. *Nucleic Acid. Res* 16: 1215.
- Mol BWJ, Collins JA, Burrows EA, Veen F et al. (1999). Comparison of hysterosalpingography and laparoscopy in predicting fertility outcome. *Human Reproduction*. 14(5): 1237-1242.
- Nakayama K, Toki T, Zhai YL, Lu X et al. (2001). Demonstration of focal p53 expression without genetic alterations in endometriotic lesions. *Int J gynecol Pathol*. 20:227-31.
- Nezhat F, Nezhat C, Allan CJ, Metzger DA et al. (1992). A clinical and histological classification of endometriomas: implications for a mechanism of pathogenesis. *J Reprod Med*. 37: 771-776.
- Pena SDJ. (2005). Razões para banir o conceito de raças na medicina brasileira. *Historia, Ciências, Saúde*. Manguinhos, v.12, n.1 p.321-46, May-Aug.
- Reis RM, Sá MFS, Moura MD, Nogueira AA et al. (2004). Familial risk among patients with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*. DOI 10.1023/ A: 102055920196; p 500-503.
- Robles AI, Linke SP and Harris CC. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*. 21,6898-6907.
- Santanam N, Murphy AA, Parthasarathy S. (2002). Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 955: 183-98.
- Schneider J, Jimenez E, Rodriguez F, del Tanago JG. (1998). c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis. *Oncol Rep* 5:49-52.
- Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. (2003). Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 30:41-61.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C et al. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature*. 393,229-234.

Vercellini P, Trecca D, Oldani S, Fracciolla NS et al. (1994). Analysis of p53 and ras gene mutations in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 38: 70-1.

Wang NM, Tsai CH, Yen KT, Chen SJ et al. (1999). P53 codon 72 arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the Chinese. *Int J Mol Med.* 4: 249-52.

Wieser F, Schneeberger C, Tong D, Tempfer C et al. (2002). PROGINs receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fertil Steril.* 77: 309-12.

Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC et al. (1999). A p53 genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology.* 29: 697-702.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H et al. (2001). P53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk for cervical cancer development. *Cancer. Res* 61, 608-611.

Zhang ZW, Laurance NJ, Hollowood A, Newcomb P et al. (2004). Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer. Res* 10, 131-135.