



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE RECEPTOR
DE PROGESTERONA (PROGINS) EM MULHERES COM
ENDOMETRIOSE**

IASMIM RIBEIRO DA COSTA

Goiânia – GO

2010



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE RECEPTOR
DE PROGESTERONA (PROGINS) EM MULHERES COM
ENDOMETRIOSE**

IASMIM RIBEIRO DA COSTA

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética MGENE da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. KÁTIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. MSc. BÁRBARA MARIOTTO BORDIN

Goiânia – GO

2010

C837a Costa, Iasmim Ribeiro da
Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona
(PROGINS) em mulheres com endometriose / Iasmim Ribeiro da
Costa. – Goiânia, 2010.
91 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Departamento de Biologia, 2010.

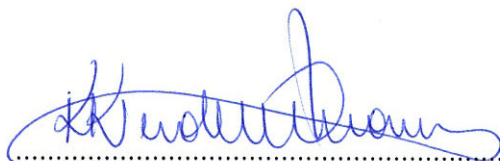
“Orientador: Kátia Karina Verolli de O. Moura”

1. Endometriose. 2. Polimorfismo do gene. 3. PROGINS.
I.Título.

CDU: 618.14-002: 575 (043.3)

TRABALHO REALIZADO JUNTO AO MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, SOB ORIENTAÇÃO DA PROF^a.
DOUTORA KÁTIA KARINA VEROLLI DE OLIVEIRA MOURA

BANCA EXAMINADORA



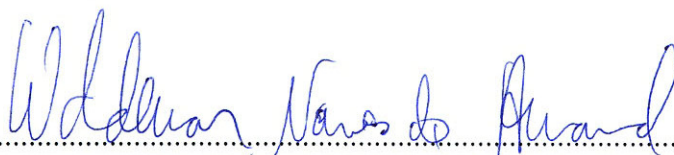
.....
Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura – MGene / PUC Goiás



.....
Dr^a Flávia de Melo Rodrigues – MGene / PUC Goiás



.....
Bárbara Mariotto Bordin, M.Sc. / PUC Goiás



.....
Dr. Waldemar Naves do Amaral / UFG

Goiânia, 09 de junho de 2010

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais Luis Carlos e Vera
Lúcia pelo amor incondicional,
dedicação constante e ininterrupta
durante toda minha vida pessoal,
acadêmica e profissional.*

*Ao meu esposo Brunno, pelo amor,
companheirismo e estímulo constante,
fazendo-me acreditar que nossos
sonhos são possíveis.*

*Aos meus irmãos Cristal e Tadeu, pelo
carinho, amizade e apoio.*

*Aos meus avós, que sempre me
amaram e contribuíram para minha
formação como ser humano.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a Dr^a Kátia Karina Verolli O. Moura, minha orientadora, por ter me aceitado como orientanda nos programas de Pós-Graduação *latu* e *strictu senso*, contribuindo para a construção do meu saber. Pela paciência, compreensão, orientação, correções e sugestões.

À Prof^a MSc. Bárbara Mariotto Bordin, minha co-orientadora, pela atenção, disponibilidade e sugestões durante o mestrado.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais que sempre me apoiaram na vida e nos estudos. Sem eles essa conquista seria impossível. Ao meu marido, pela paciência e por estar comigo neste momento tão feliz. Aos meus irmãos, avós, minha sogra e toda minha família que permanece sempre na torcida.

Ao médico ginecologista Circoncisto L. Ribeiro Júnior, por ter gentilmente compartilhado as amostras de suas pacientes com endometriose.

A todos os meus colegas e funcionários do Replicon: Rita, Ariane, Constanza, Suelene, Jalsi, Caroline, Emília, Eduardo, Damiana e as pessoas da iniciação científica.

Aos meus chefes professores Mauro Meira e Wilson Cruvinel pela compreensão e flexibilidade, quando foi preciso.

Aos meus colegas da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia pela ajuda, colaboração e por participarem do grupo controle.

Aos professores do mestrado em genética e, em especial, aos professores Dr^a Kátia Karina, Dr^a Flávia Melo, Dr^a Daniela de Melo, Dr. Aparecido (Peixoto) e Dr. Breno Vasconcellos.

A todos os meus amigos pela compreensão quando estive ausente.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de estudo a mim concedida e financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ANEXOS	x
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xí
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Ciclo Menstrual	15
1.2 Endometriose	16
1.3 Morfologia	18
1.4 Epidemiologia	21
1.5 Etnia	22
1.6 Etiopatogenia	22
1.7 Diagnóstico	24
1.8 Tratamento	25
1.9 Hormônios associados à endometriose	25
1.10 Endometriose e a infertilidade	26
1.11 Escape do Sistema Imunológico - Imune celular e humoral	28
1.12 Doenças associadas à endometriose	29
1.13 Genes associados à endometriose	29
1.14 Marcadores moleculares	31
1.14.1 Gene Receptor de Estrógeno	31
1.14.2 Gene <i>p53</i>	32
1.14.3 Polimorfismos de Genes Responsáveis pela Metabolização de Xenobióticos	33
1.14.3.1 Aromatase	34
1.14.3.2 Gene Glutathione S-Transferase (GST)	36
1.14.4 Gene Receptor de Progesterona	37
1.14.4.1 Polimorfismo do Gene Receptor de Progesterona (PROGINS)	39
2. OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVOS GERAIS	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. JUSTIFICATIVAS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Casuística	44
4.2 Extração de DNA genômico	45
4.3 Reação em Cadeia de Polimerase – PCR	45
4.4 Análise dos resultados	49
5. RESULTADOS ENCONTRADOS	51
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO I	86
ANEXO II	87
ANEXO III	89
ANEXO IV	90
ANEXO V	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo menstrual. (Fonte: Figura modificada de Lobato, 2007).....	15
Figura 2: Principais locais da endometriose dentro da pelve e do abdômen. (Fonte: Figura modificada de Olive, Pritts 2001).	18
Figura 3: Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário. (Fonte: Ribeiro Júnior, 2009).	19
Figura 4: Lesão negra, azulada ou arroxeadada, pregueada, associada a uma cicatrização em forma de estrela decorrente de sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos. (Fonte: Ribeiro Júnior, 2009).	20
Figura 5: Lesão branca com pontos de sangramento. (Fonte: Ribeiro Júnior, 2009).	20
Figura 6: Posição relativa ao PROGINS, braço longo do cromossomo 11, nas bandas 22-23. (Fonte: NCBI).....	37
Figura 7: Estrutura das isoformas PR-A e PR-B do receptor de progesterona. (Fonte: Giacomazzi 2008).	38
Figura 8: Localização da inserção <i>Alu</i> que caracteriza o complexo polimórfico PROGINS. (Fonte: Figura modificada de Treloar et al., 2005).	40
Figura 9: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os possíveis genótipos para o polimorfismo PROGINS.	46
Figura 10: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os possíveis genótipos para o polimorfismo do gene <i>p53</i>	48
Figura 11: Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose e controle.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Sequência dos <i>primers</i> do PROGINS e tamanho esperado dos fragmentos..	45
Tabela II: Protocolo para a amplificação do polimorfismo do PROGINS para PCR.....	46
Tabela III: Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers</i> PROGINS para técnica de PCR.....	47
Tabela IV: Sequência dos <i>primers</i> p53-PRO e tamanho esperado dos fragmentos.	47
Tabela V: Sequência dos <i>primers</i> p53-ARG e tamanho esperado dos fragmentos.	47
Tabela VI: Protocolo para a amplificação do polimorfismo no códon 72 do p53-PRO.	48
Tabela VII: Protocolo para a amplificação do polimorfismo no códon 72 do p53-ARG.	49
Tabela VIII: Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers</i> p53-PRO.	49
Tabela IX: Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers</i> p53-ARG.	49
Tabela X: Comparação entre as idades dos grupos de pacientes com endometriose e controle.....	51
Tabela XI: Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose e controle.....	51
Tabela XII: Distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS correlacionada com a classificação da endometriose (Grau I/II) ou (Grau III/IV) e grupo controle.	52
Tabela XIII: Correlação entre a presença ou ausência de fertilidade e o grau de endometriose.....	53
Tabela XIV: Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nas pacientes com endometriose férteis (Grupo I) e inférteis (Grupo II).	53
Tabela XV: Correlação entre os genótipos do polimorfismo PROGINS das pacientes do grupo endometriose e as variáveis: queixa principal, período de	

dor e sangramento e intensidade da dor pélvica.....	54
Tabela XVI: Correlação entre as variáveis estudadas e os grupos endometriose e controle.....	56
Tabela XVII: Comparação da variável cor da pele com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.	58
Tabela XVIII: Comparação da variável atividade física com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.	59
Tabela XIX: Comparação da variável hábito de fumar com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.	60
Tabela XX: Comparação da variável hábito de ingerir bebida alcoólica com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.....	62
Tabela XXI: Comparação da variável uso de anticoncepcional com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.....	63
Tabela XXII: Distribuição dos polimorfismos PROGINS e p53 nos grupos endometriose e controle.....	64
Tabela XXIII: Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do polimorfismo PROGINS em relação à endometriose.....	91

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: QUESTIONÁRIO: Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em pacientes com endometriose associado à infertilidade.....	86
ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecimento	87
ANEXO III: Consentimento da participação da pessoa como sujeito.....	89
ANEXO IV: Sensibilidade e especificidade do primer do gene receptor de progesterona (PROGINS)	90
ANEXO V: Análise de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do polimorfismo PROGINS em relação à endometriose.....	91

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ASMR	Academia Americana de Medicina Reprodutiva
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CA	Antígeno Carcinogênico
CYP	Citocromo P450
d.C.	Depois de Cristo
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etileno tetra-acético
Endo Grau I/II	Endometriose grau I ou II
Endo Grau III/IV	Endometriose grau III ou IV
Endo+Fert	Endometriose fértil
Endo+Inf	Endometriose infértil
ER	Receptor de estrógeno
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i>
FAN	Fator antinuclear
g	Grama
GnRh	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GST	Glutationa
H ₂ O	Água
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
K	Kilo
kb	kilobases
L	Litro
Ld	Marcador de tamanho ou escada alélica (<i>Ladder</i>)
LH	Hormônio Luteinizante
LUF	Síndrome da luteinização do folículo não roto

m	Mili
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
n	Número
NATs – N	N-acetiltransferase
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
p53Arg	Proteína p53 com aminoácido arginina no códon 72
p55Pro	Proteína p53 com aminoácido prolina no códon 72
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PR	Receptor de progesterona
PROGINS	Polimorfismo do Gene Receptor de Progesterona
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucléico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato de EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
Th	Linfócito T auxiliar
U	Unidade
V/cm	Volts por centímetro
11q22-23	Braço longo do cromossomo 11, nas bandas 22-23
15q21.2	Braço longo do cromossomo 15, na banda 21.2
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
β	Beta
μ	Micro
∞	Infinito
[]	Concentração

RESUMO

A endometriose é definida como aparecimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticos aos da cavidade uterina em outras localizações, que não o endométrio, apresentando um forte componente genético. Incide principalmente em mulheres em idade reprodutiva, podendo estar relacionada com infertilidade em 30% a 40% dos casos. É uma patologia de diagnóstico histológico, devendo o mesmo, confirmar as suspeitas clínicas e os achados macroscópicos encontrados em cirurgias. Pode afetar vários órgãos, sendo por isso mesmo denominada atualmente de multi-sistêmica. A expressão exagerada de receptores de estrogênio e defeitos no receptor de progesterona são conseqüências da anormalidade do efeito progestacional sobre o endométrio tópico e ectópico. Alterações da sua função podem, portanto, facilitar o aparecimento da moléstia porque, no sentido amplo, deixa de antagonizar os efeitos proliferativos dos estrogênios. Recentemente, vários polimorfismos do receptor de progesterona têm sido descritos. Dentre eles destaca-se o polimorfismo PROGINS que consiste em uma inserção *Alu* de 306 pb no íntron G entre o exon 7 e 8 do gene do receptor de progesterona humano. Este estudo tem como objetivo verificar a possível correlação entre a endometriose e o Polimorfismo do Gene do Receptor de Progesterona (PROGINS). O grupo endometriose foi composto por 54 pacientes de um centro de referência em videolaparoscopia e infertilidade de Goiânia (FÉRTILE). O grupo controle incluiu 45 mulheres sem diagnóstico de endometriose por anamnese. Os genótipos para o polimorfismo PROGINS (A1/A1, A1/A2 e A2/A2) foram determinados por PCR. A frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2 e A2/A2) é duas vezes maior nas pacientes com endometriose (33,3%) do que no grupo controle (15,5%). Houve significância estatística que indicasse a associação entre o polimorfismo PROGINS e a patologia endometriose ($P = 0,0426$).

Palavras-Chave: endometriose, receptor de progesterona, PROGINS, PCR.

ABSTRACT

Endometriosis is defined by the appearance of foci of endometrial tissue with glandular features and / or stromal identical to the uterine cavity at locations other than the endometrium, showing a strong genetic component. It focuses primarily on women of reproductive age and may be related to infertility in 30% to 40% of the cases. It's a histological diagnosis of pathology, which must be confirmed the clinical suspicion and the macroscopic findings found in surgery. It can affect several organs, and because of it is called multi-systemic. The exaggerated expression of estrogen receptors and progesterone receptor defects are consequences of the abnormality of the progestational effect on the endometrium and ectopic topic. Changes in its function may thus facilitate the emergence of the disease because, in the broad sense, fails to antagonize the proliferative effects of estrogens. Recently, several polymorphisms of the progesterone receptor have been described. Among them stands out PROGINS polymorphism Alu consisting of a insertion 306 bp in the intron G between the exon 7 and 8 of progesterone receptor gene in humans. This study aims to determine the possible correlation between endometriosis and polymorphisms of the Progesterone Receptor Gene (PROGINS). The endometriosis group consisted of 54 patients from a referral center for infertility laparoscopy-video and infertility of Goiania (FÉRTILE). The control group included 45 women without history of endometriosis by anamnesis. Genotypes for PROGINS polymorphism (A1/A1, A1/A2 and A2/A2) were determined by PCR. The frequency of polymorphic genotypes (A1/A2 and A2/A2) is two times higher in patients with endometriosis (33,3%) than in the control group (15,5%). Statistical significance was found indicating an association between the polymorphism PROGINS and pathology endometriosis ($P = 0,0426$).

Keywords: endometriosis, progesterone receptor, PROGINS, PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo Menstrual

O ciclo menstrual é um período que ocorre normalmente de 28 em 28 dias, tendo início na menarca (primeira menstruação) e terminando na menopausa (cessação da menstruação). Pode ser dividido em três fases: folicular, que se inicia no primeiro dia do fluxo menstrual; ovulatória, que pode durar até três dias; e lútea, que vai do fim da ovulação até o início do fluxo. No começo de cada ciclo menstrual, o endométrio apresenta-se fino. Ao final da menstruação (descolamento do endométrio acompanhado por sangramento), a elevação da concentração plasmática de estradiol durante a fase folicular aumenta de três a cinco vezes a espessura do endométrio, caracterizando a fase proliferativa. Logo após a ovulação, o aumento acentuado da progesterona altera o endométrio, inibindo seu crescimento rápido e a atividade mitótica (Castelli, 2008; Lobato, 2007) (Figura 1).

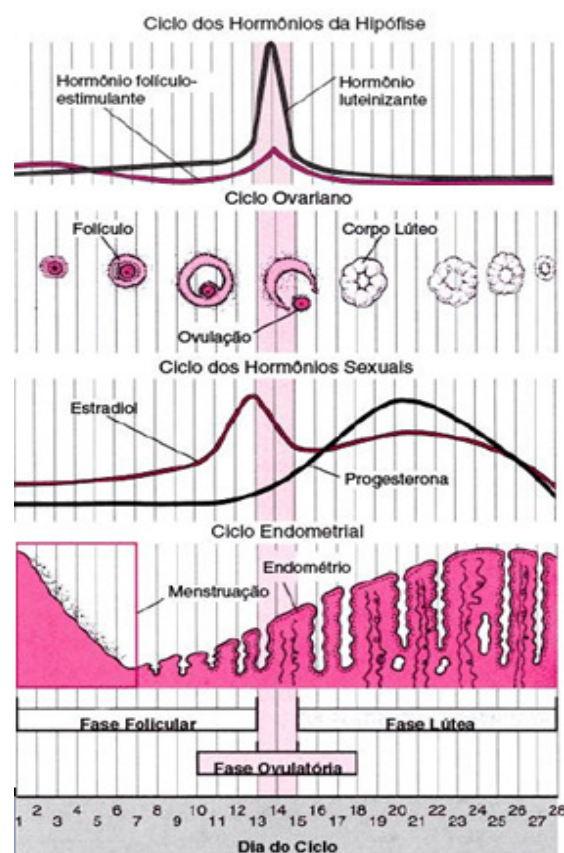


Figura 1: Ciclo menstrual.
Fonte: Figura modificada de Lobato, 2007.

Após a maturação e rompimento do folículo ovariano ocorre o desenvolvimento do corpo lúteo, que por sua vez produz o hormônio progesterona que impede a descamação do útero. Nas fases folicular e ovulatória, são secretadas grandes quantidades de estrogênios, enquanto que na fase lútea ocorre o predomínio de progesterona. Se não houver fecundação, o corpo lúteo vai regredindo de modo que a produção de progesterona diminui até cessar e então, ocorre à menstruação (Melegario et al., 2006; Lima, 1996) (Figura 1).

1.2 Endometriose

A endometriose é uma enfermidade inflamatória crônica dolorosa, que representa um dos transtornos ginecológicos benignos mais comuns. É uma patologia heterogênea que se desenvolve em mulheres na idade reprodutiva e regride espontaneamente após a menopausa (Renner et al., 2006; Lima et al., 2006; Johnson et al., 2004).

É definida como aparecimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticos aos da cavidade uterina em outras localizações que não o endométrio (Giordano, 1998). É uma doença que tem um forte componente genético (Tempfer et al., 2009). Recentemente conceitua-se a enfermidade como a presença de tecido semelhante ao endométrio, fora do útero, induzindo uma reação crônica e inflamatória, seguindo a orientação da *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE). Histologicamente é descrita como tecido extra-uterino com características semelhantes ao do endométrio tópico (Riachi, 2008; Kamergorodsky, 2007).

Segundo relatos, a primeira descrição dos sintomas característicos da endometriose, bem como o tratamento para as alterações menstruais provocados pela doença, teria ocorrido em 1600 antes de Cristo, conforme descrição presente no Papiro Egípcio de Ebers (Nakata et al., 2004). Em 1835 d.C. Cruveilhier faz referência a lesões císticas de anexos, útero e vagina (Baranova et al., 1997) e Carl Von Rokitansky, em 1860 d.C. na Alemanha, faz a primeira descrição patológica de um caso de endometriose ao se deparar com a presença de tecido semelhante ao endométrio, ectópico, em peças de

necropsia (Giordano, 1998).

O implante endometrial ocorreria pela influência de um ambiente hormonal favorável e de fatores imunológicos que não eliminariam essas células deste local impróprio (Podgaec, 2006). A endometriose tem características de invasão e metástase, embora patologicamente se assemelhe a um tumor benigno (Treloar et al., 2005).

Tal moléstia pode manifestar-se de múltiplas formas, sendo os achados mais comuns a dor pélvica e a infertilidade. Dentre todos os seus variados sintomas é observado com maior frequência a dismenorréia (dor pélvica durante a menstruação), independentemente de sua localização, podendo apresentar ainda alterações do padrão menstrual, dispareunia profunda (dor durante o ato sexual), dor pós-coito e algia pélvica contínua (Riachi, 2008; Dentillo, 2007).

Há relatos de endometriose associada a anomalias congênitas obstrutivas (estenose ou atresia cervical, agenesia de vagina ou hímen imperfurado) em adolescentes, sendo uma patologia pouco frequente antes da menarca e após a menopausa, por isso mesmo, rara em mulheres amenorréicas. A gravidez precoce e sucessivas gestações parecem prevenir o desenvolvimento da doença (Moura et al., 1999).

A evolução da endometriose ocorre em cinco etapas importantes: 1) adesão da célula endometrial na superfície peritoneal; 2) invasão destas células no mesotélio; 3) recrutamento de células inflamatórias; 4) angiogênese ao redor do implante; 5) proliferação das células endometriais. Também influenciam na endometriose, fatores ambientais e hormonais, mensageiros celulares, moléculas de adesão e as citocinas também influenciam na endometriose (Yáñez e González, 2007).

É uma doença que pode afetar vários órgãos (peritônio pélvico, trompas, ovários, tecido subcutâneo, umbigo, trato urinário, bexiga, coração, rim, pulmão, fígado, pâncreas, músculos, sistema nervoso central, etc.), fato que a denomina atualmente de multi-sistêmica (Figura 2) (Renner et al., 2006; Olive e Pritts, 2001; Ranney, 1980).

As lesões endometrióticas são mais frequentes no peritônio e os órgãos pélvicos, principalmente os ovários, seguidos pelo septo reto-vaginal. É encontrada com menor frequência em regiões extra pélvicas, localizadas com

maior frequência nos tratos gastrointestinais (sigmóide, reto, área ileocecal e apêndice) e urinário. Raramente, pode acometer outras partes do corpo, como pulmões, tórax, pericário e cérebro (Dentillo, 2007).

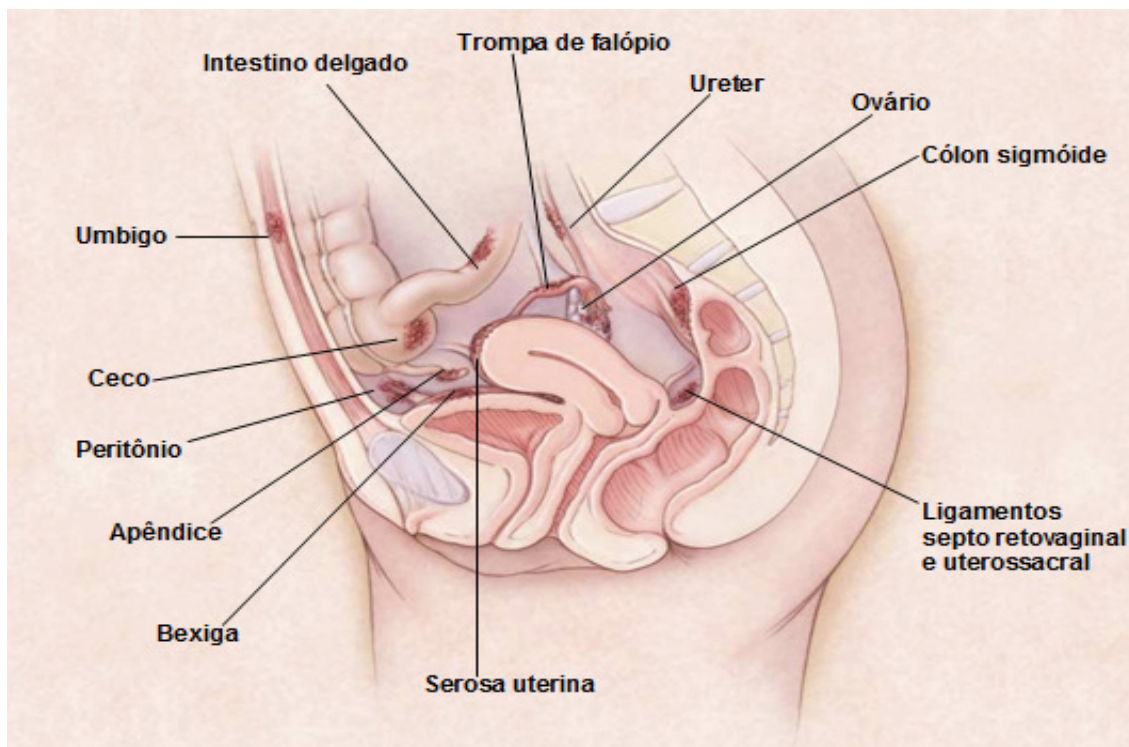


Figura 2: Principais locais da endometriose dentro da pelve e do abdômen.
Fonte: Figura modificada de Olive e Pritts, 2001.

No que diz respeito à sintomatologia clínica, a endometriose comporta-se de maneira diferente do esperado, ocorrendo com maior frequência em pacientes que apresentam sintomas exacerbados em relação às manifestações de dor e/ou infertilidade, mas que são diagnosticados laparoscopicamente como tendo endometriose mínima. Por outro lado, também não é infrequente o diagnóstico ocasional de pacientes em graus mais avançados da doença e que são completamente assintomáticas no que diz respeito aos sintomas clínicos e à possibilidade de gravidez (Bedone, 1994).

1.3 Morfologia

Macroscopicamente a morfologia das lesões é bastante variável. Múltiplas formas e colorações caracterizam o espectro da endometriose (Kamergorodsky, 2007).

Morfologicamente, os implantes peritoneais e ovarianos podem ser diferenciados em: lesões vermelhas, negras (azuladas ou arroxeadas, pregueada) e brancas (Figuras 3, 4 e 5 respectivamente). As lesões vermelhas são mais agressivas, ativas e elevadas, apresentando histologia semelhante ao epitélio eutópico proliferativo. Além disso, acredita-se serem mais vascularizadas e com maior poder invasivo, correspondendo ao primeiro estágio de desenvolvimento da doença. Já as lesões negras, também ativas, correspondem ao estágio mais avançado da doença. As lesões brancas são menos vascularizadas e inativas, aparecendo posteriormente às lesões negras e apresentando aspecto cicatricial (Meola, 2008).

Nos estádios iniciais da doença as lesões têm coloração vermelha como o endométrio, mas após algum tempo, essas células estimulam uma resposta inflamatória e adquirem coloração bem escura. O grau de evolução das lesões varia de vesícula não pigmentada transparente para vesícula rósea avermelhada, marrom clara, marrom escura, enegrecida e, por fim, branca quando ocorre fibrose do tecido. Os implantes podem ser polipóides (com invasão do tecido conectivo subperitoneal), císticos ou apresentarem lesões fibróticas e inflamatórias (Berbel et al., 2008; Kamergorodsky, 2007).



Figura 3: Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário.
Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.

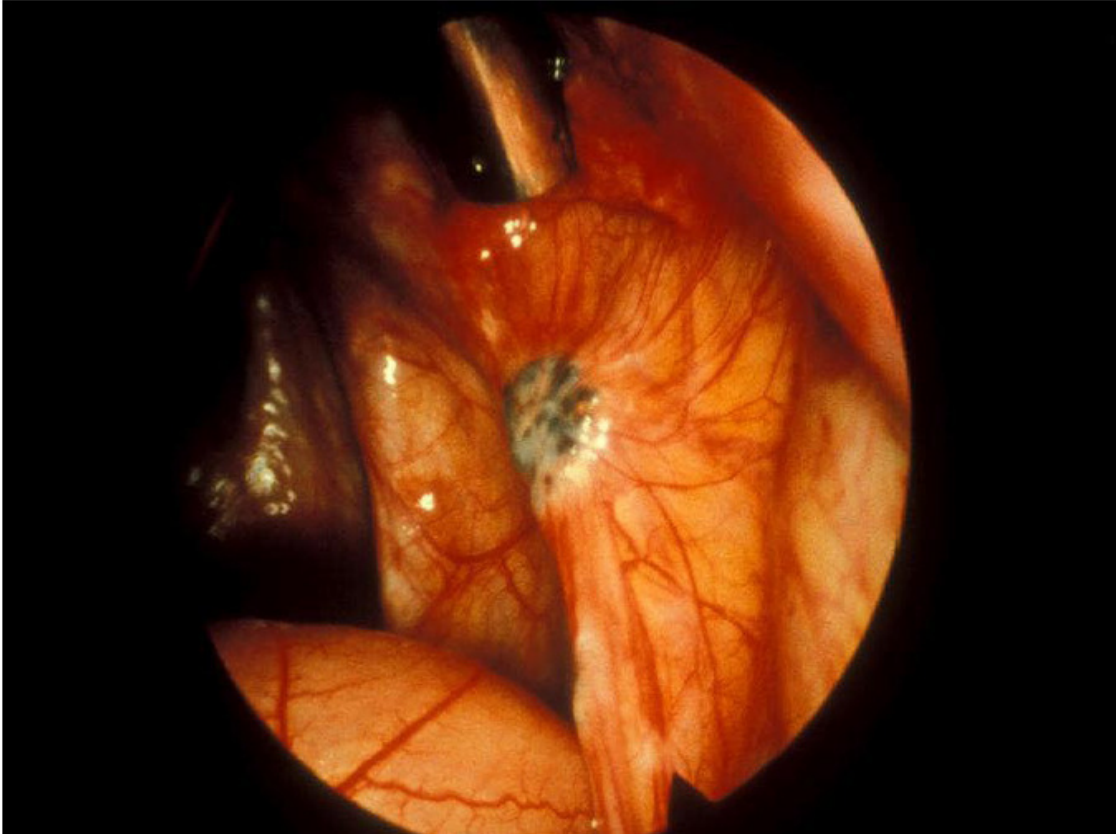


Figura 4: Lesão negra, azulada ou arroxeadada, pregueada, associada a uma cicatrização em forma de estrela decorrente de sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos.
Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.

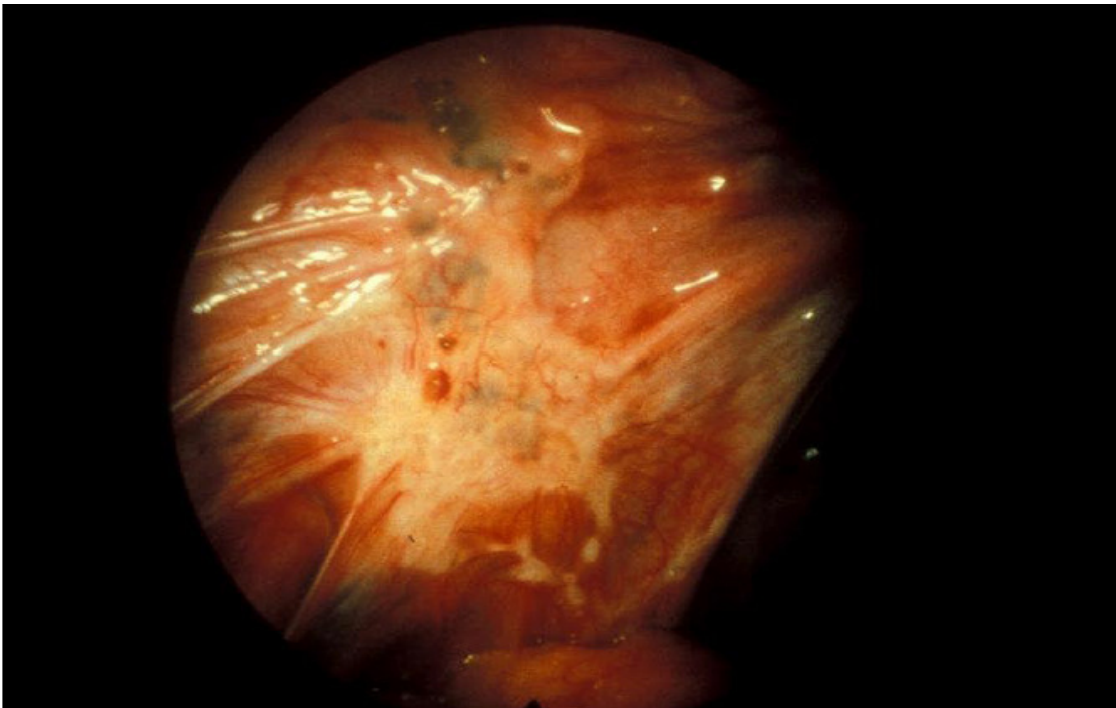


Figura 5: Lesão branca com pontos de sangramento.
Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.

1.4 Epidemiologia

Um número significativo de mulheres que se queixam de dismenorréia e dor pélvica apresentam endometriose. Mais de 50% das mulheres com infertilidade inexplicada são diagnosticadas com esta patologia através da laparoscopia e sua incidência parece estar aumentando (Lima et al., 2006).

A incidência de endometriose é estimada em 5%, com uma prevalência de 10% (Bahtiyar et al., 1998). Estima-se que sua frequência varia de 10-15% em mulheres com idade reprodutiva, 3% na pós-menopausa (Berbel et al., 2008; Hurtado, 2008) e em mais de 30% em mulheres com problemas de fertilidade (Renner et al., 2006), aumentando para 70% em pacientes com dor pélvica crônica. Mulheres assintomáticas a sua prevalência podem alcançar 16%, estando relacionadas com a infertilidade em 30% a 40% dos casos (Kamergorodsky, 2007; Moura et al., 1999).

A incidência de envolvimento intestinal em mulheres com endometriose varia de 3 a 34%. Muitas lesões são assintomáticas e descobertas acidentalmente em uma laparotomia indicada por outras razões. As áreas comumente envolvidas são: o reto e o sigmóide em 85% dos casos; o ceco, em 3,6%; e o apêndice, em 3% das pacientes. O envolvimento do intestino delgado pode ser observado em 0,5 a 7% das lesões intestinais sendo a porção terminal do íleo a mais envolvida. Quando ocorre comprometimento intestinal, observa-se em diferentes intensidades, diarreia, obstipação, tenesmo, náuseas, vômitos, febre, anorexia, perda de peso e sangue nas fezes (Ribeiro et al., 2008).

Um endometrioma umbilical é uma condição rara, com incidência de 0,5 a 1% de todos os pacientes com ectopia endometrial. O desenvolvimento desse tipo de endometrioma pode ocorrer após procedimentos cirúrgicos laparoscópicos envolvendo o umbigo (Chatzikokkinou et al., 2009).

Um estudo realizado no Setor de Endometriose do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo demonstrou que vários fatores podem influenciar o cálculo estatístico da prevalência e incidência de mulheres com endometriose, causando erro nos estudos epidemiológicos. Destaca-se que um grande número de mulheres com endometriose e nível sócio-econômico mais baixo não procuram atendimento e

não são inseridas nos estudos. Somente as mulheres inférteis que têm desejo de engravidar e procuram tratamento são diagnosticadas com a patologia (Berbel et al., 2008).

1.5 Etnia

Diversos estudos buscaram comprovar a participação da raça como fator de risco para a endometriose, porém o que foi observado é uma grande controvérsia entre as mais diversas pesquisas. Em um trabalho realizado por Kirshon e colaboradores (1989) observou-se que a incidência de endometriose em pacientes hispânicas brancas e negras era semelhante, ou seja, a raça não influencia na incidência da endometriose, enquanto alguns autores defendem a prevalência da doença na raça negra e outros destacam a raça amarela como a predominante (Marques, 2005).

Em revisões da literatura verificam-se que muitos estudos são baseados em populações brancas do sexo feminino e geralmente sabe-se que a endometriose não é comum entre negras. Em um estudo comparando pacientes japonesas e americanas verificou-se uma maior incidência de endometriose em mulheres orientais quando comparadas as não-orientais (Miyazawa, 1976).

Na população caucasiana observamos uma frequência de endometriose de aproximadamente 10% (Baranova et al., 1997).

1.6 Etiopatogenia

Embora a endometriose seja considerada uma doença enigmática de etiopatogenia incerta e tratamento variável, várias alterações imunológicas e bioquímicas estão presentes nesses pacientes (Velasco et al., 2006).

É uma patologia referenciada como “doença da mulher moderna” quando analisada pelo ponto de vista biopsicossocial. Pode-se dizer que a endometriose é um mau recente, pois antigamente como as mulheres engravidavam mais cedo e tinham mais filhos o fato de menstruarem menos fazia com que tivessem menor risco de apresentar a enfermidade. Alguns especialistas afirmam que as mulheres antigas menstruavam em média 60

vezes durante a vida fértil. Hoje esse número subiu para 600, aumentando a quantidade de sangramentos (Vila, 2007; Lorençatto et al., 2002).

Algumas teorias foram propostas para explicar o desenvolvimento da doença. Dentre as teorias clássicas, atribui-se a endometriose ao fluxo menstrual retrógrado, à transformação metaplásica ou mesmo à deposição iatrogênica em procedimentos cirúrgicos (Carvalho et al., 2008).

Sampson em 1927 propôs a teoria da menstruação retrógrada, descrevendo a endometriose da forma como é conhecida atualmente, sugerindo-a como provável etiologia após a observação de sangue saindo pelas tubas uterinas e no lúmen das trompas de mulheres operadas durante a menstruação (Riachi, 2008; Berbel et al., 2008; Abrão, 2000). Muitas críticas surgiram para essa teoria devido à presença de fatos inexplicados, como a presença de tecido endometrial ectópico em regiões anatômicas remotas (como nos pulmões), sendo estes quadros que não corroboram com a teoria do refluxo tubário (Hurtado, 2008). Outro fato é que a endometriose desenvolveu-se em apenas um grupo de mulheres, apesar da menstruação retrógrada ser um fenômeno quase universal (Bahtiyar et al., 1998).

Mesmo com algumas divergências, a teoria da menstruação retrógrada 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 (Nakata et al., 2004; Chaco et al., 1987).

A teoria da metaplasia ou teoria da transformação metaplásica descreve um processo aberrante de diferenciação celular que ocorre no local resultando em tecido endometrial (Renner et al., 2006). Segundo essa teoria, o mesotélio do peritônio poderia transformar-se em vários tipos de epitélios, como tecido endometrial, o que explicaria o implante ectópico em áreas extrauterinas (Kamergorodsky, 2007). Essa teoria poderia justificar os raros casos de endometriose em homens (Ejzenberg, 2007).

A endometriose da parede abdominal pode ser encontrada principalmente após cirurgias em que há invasão da cavidade endometrial tais

como cesariana e laparoscopias. Considera-se que a manipulação do tecido endometrial possa permitir a implantação de suas células nos diferentes planos da parede abdominal durante o fechamento da cavidade ocorrendo principalmente na cicatriz operatória (Carvalho et al., 2008).

A endometriose 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 (Halme, 1984). De fato, o encontro de focos endometriais ectópicos seria a consequência de múltiplos fatores causais dentro de uma dinâmica complexa ao longo do tempo, o que determina o surgimento das múltiplas formas descritas da patologia (Rodrigues, 1995).

A descoberta histológica de endometriose em homens é rara, e tem sido associada às altas doses de estrógeno no tratamento de câncer de próstata (Singh et al., 2008).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico da endometriose envolve o quadro clínico, a utilização de marcadores e a laparoscopia. Os marcadores são substâncias que tem sua concentração aumentada ou diminuída em determinadas épocas do ciclo menstrual e que servem como parâmetro para a avaliação do estágio da doença (Berbel et al., 2008).

Muitos autores estudam a correlação entre a doença e os antígenos tumorais Ca-125 e Ca 19-9, os quais são detectados em maiores quantidades no soro de portadoras principalmente em estágios mais avançados. Porém, esses marcadores, apesar de serem de alta especificidade, possuem baixa sensibilidade (Dentillo, 2007). O Ca-125 é um dos marcadores mais utilizados. É uma glicoproteína de alto peso molecular (> 20.000 Da) de origem epitelial encontrado em células normais, produzido no epitélio celômico durante o desenvolvimento embrionário. A coleta do sangue para realização do Ca-125 deve ser feita nos três primeiros dias do ciclo menstrual. Em estágios mais avançados da endometriose encontramos concentrações elevadas de Ca-125 (Amaral et al., 2006).

O fluido folicular torna-se parte do fluido peritoneal depois da ovulação e

possui fator de crescimento do endotélio vascular, fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-1 e IGF-2), fator de necrose tumoral α (TNF- α), citocinas, como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1, fator inibitório da leucemia, assim como as prostaglandinas e hormônios esteróides. Os níveis de fluido folicular de certas citocinas e os fatores de crescimento diferenciam mulheres com e sem endometriose (Bahtiyar et al., 1998).

Apesar de diversas pesquisas buscarem métodos laboratoriais que permitam o diagnóstico da moléstia sem a necessidade de um procedimento cirúrgico, a endometriose ainda é uma doença de diagnóstico histológico, pois depende de métodos invasivos como a laparoscopia, que torna possível a visualização das lesões sugestivas da doença e a obtenção de amostra tecidual que confirme, pela análise histológica, essa suspeita (Podgaec, 2006).

1.8 Tratamento

O tratamento adequado deve ser individualizado para cada paciente. A recomendação para tratamento medicamentoso e/ou cirúrgico depende da ausência ou presença de sintomas, do grau da doença, da idade da paciente e sua futura ambição de fertilidade. O tratamento cirúrgico é indicado nos casos em que há danos ovarianos e tubários, cistos endometrióticos e outras doenças ginecológicas associadas ou quando houver falha na terapia com drogas. No caso de doenças recorrentes ou no início do tratamento é recomendada terapia medicamentosa. A histerectomia é indicada somente em casos extremos (Meola, 2008).

1.9 Hormônios associados à endometriose

A progesterona é o hormônio da gravidez. É requerida em todos os mamíferos para o desenvolvimento e manutenção do endométrio permitindo a implantação e manutenção da gravidez. A deficiência de progesterona ou defeitos na fase lútea tem sido propostos como uma etiologia da falha de implantação (Coulam et al., 2008).

A progesterona juntamente com o estrógeno são importantes

reguladores do sistema reprodutivo feminino e encontram-se envolvido na gênese tumoral. São responsáveis pela maturação dos oócitos, manutenção e estabelecimento da gestação, bem como pelo desenvolvimento da mama e conservação do endométrio (Giacomazzi, 2008; Pooley et al., 2006; Fabjani et al., 2002).

A estimulação excessiva de estrogênio sem oposição de progesterona predispõe fortemente ao câncer de endométrio (De Vivo et al., 2002). A endometriose é considerada uma doença estrogênio-dependente, uma vez que o estrogênio se faz necessário para o desenvolvimento da patologia (Abrão, 2000).

O efeito antagonista da progesterona sobre os estrógenos levaram a sua prescrição durante mais de 40 anos para o tratamento da endometriose, devido ao seu efeito supressor do eixo hipotálamo-hipófise-ovário que reduz as concentrações séricas de estrógenos e também ao efeito direto sobre o endométrio, em que gera a decidualização e atrofia do endométrio eutópico e das lesões endometriais, além da inibição da angiogênese e diminuição dos marcadores da inflamação peritoneal (Yáñez e González, 2008).

A progesterona juntamente com o 17β -estradiol são reguladores da diferenciação e proliferação no trato genital feminino. Respostas alteradas de estrogênio e progesterona levam a desordens dependentes de hormônios esteróides como a endometriose, o câncer endometrial, a subfertilidade e o câncer de mama e ovário (Romano et al., 2007).

A supressão medicamentosa dos níveis de estradiol mediante inibidores da enzima aromatase ou hormônios agonistas da liberação de gonadotrofinas (GnRH) produz um regressão da patologia (Johnson et al., 2004).

Fortes evidências apóiam que a terapia de reposição hormonal em mulheres pós-menopáusicas aumenta o risco de câncer de endométrio. O aumento de estrogênio endógeno no ciclo ovariano prolongado e a obesidade também contribuem para o risco desta patologia. Em contraste, a progesterona neutraliza potentemente o desenvolvimento do câncer de endométrio estrogênio-dependente (De Vivo et al., 2002).

1.10 Endometriose e a infertilidade

A infertilidade é uma condição que afeta entre um quinto a um sexto dos casais em idade reprodutiva. Segundo a *Academia Americana de Medicina Reprodutiva* (ASMR) e a *Organização Mundial de Saúde* (OMS), a infertilidade é definida como a incapacidade de um casal conseguir uma gravidez após doze meses de relações sexuais frequentes (duas a três vezes por semana), sem proteção anticoncepcional (Silva et al., 2005; Borlot et al., 2004). Ela é dita primária quando se refere a casais que nunca tiveram filhos. A infertilidade secundária significa que ocorreu pelo menos uma concepção, mas atualmente o casal não consegue uma gestação (Vila, 2007; Fernandes et al., 2000).

A associação entre endometriose e infertilidade é bastante estudada e os fatores que contribuem para tanto incluem deficiência do crescimento folicular, concentrações de hormônios circulantes aberrantes, redução da fertilização do ovócito e da taxa de implantação, fibrose e adesão causadas por distorções anatômicas (Renner et al., 2006; Olive e Pritts, 2001).

Os mecanismos que como a endometriose ocasionam a infertilidade são: (a) interferência com a função sexual (dispareunia, redução da frequência de coitos). (b) Interferência com a ovulação: (anovulação; fase lútea deficiente; LUF (síndrome da luteinização do folículo não-roto). (c) distorção da anatomia pélvica devido adesões endometrióticas, que poderiam prejudicar a liberação do oócito ou inibir seu transporte. (d) função peritoneal alterada em pacientes com endometriose devido o aumento do fluido peritoneal, aumento da concentração de macrófagos ativados, prostaglandinas, interleucinas 1 (IL-1), TNF (Fator de necrose tumoral) e proteases. Tais alterações causariam efeitos adversos no oócito, nos espermatozóides e no embrião. Porém esses mecanismos ainda não são totalmente conhecidos (Meola, 2008; Moura et al., 1999).

Entretanto, para mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve, a causa da infertilidade não é totalmente entendida, mas é considerada um envolvimento hormonal, imunológico, proliferativo (endometrial) e de alterações uterinas. Sabe-se que até 60% das pacientes com infertilidade podem apresentar implantes endometrióticos (Glitz et al., 2009; Glitz, 2006).

Em mulheres com endometriose em estágio mais avançado, as alterações anatômicas, como obstrução tubária e 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 provoca infertilidade em pacientes que não apresentam modificações anatômicas importantes (endometriose mínima ou leve) ainda não são bem claros (Fakih et al., 1987).

1.11 Escape do Sistema Imunológico - Imune celular e humoral

Devido à endometriose ser multifatorial, existe a possibilidade de haver um mecanismo imunológico ou auto-imune no seu desenvolvimento. Por esse motivo alguns autores se dedicaram a esse estudo, onde detectaram uma série de anormalidades no sistema imune (Podgaec, 2006).

As células do endométrio que se implantam fora do seu local habitual de desenvolvimento deveriam, teoricamente, ser fagocitadas ou destruídas por células de defesa do organismo. Nas mulheres com endometriose, a varredura dessas células não deve ocorrer de forma eficiente, dando início ao desenvolvimento da endometriose (Berbel et al., 2008; Podgaec, 2006).

Alguns estudos postulam que, nos estádios iniciais da endometriose, para que o endométrio consiga se implantar, a resposta celular do sistema imunológico ou resposta Th1 deve ser inibida para que a citotoxicidade dos linfócitos não impeçam as células endometriais de se instalarem. A resposta Th1/Th2 deve estar desequilibrada. A queda da imunidade peritoneal favorece o implante e o aparecimento da doença, mais especificamente uma diminuição da atividade dos linfócitos *natural killers* (NK), que agem contra antígenos endometriais. Em muitos estudos, altos níveis de citocinas foram encontrados no fluido peritoneal. A diminuição da atividade celular está relacionada com a gravidade da doença (Glitz et al., 2009; Berbel et al., 2008; Vila, 2007).

Níveis anormais de muitas citocinas diferentes como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) têm sido descritos no soro e fluido peritoneal de mulheres com endometriose, envolvendo assim estas citocinas na progressão da doença e sua infertilidade associada (Glitz et al., 2009; Velasco et al., 2006).

Interleucina-18 (IL-18) é uma citocina que pertence à família IL-1 que pode favorecer a progressão da endometriose. Além disso, IL-18 atua em

sinergia com a IL-12 a promover o desenvolvimento da resposta T *helper* (auxiliar) e uma mudança para o padrão Th1 (Glitz et al., 2009).

Mulheres com endometriose têm reduzida imunidade celular no sangue periférico e no líquido peritoneal. Sabe-se também que os parâmetros associados com o estresse podem alterar significativamente vários parâmetros imunológicos, incluindo o número de células, bem como suas funções (Lima et al., 2006).

Distúrbios auto-imunes mais sutis como a presença de fator anti-nuclear (FAN), anticorpos anti-ribonucleoproteínas, consumo de complementos e presença de anticorpos anticardiolipinas IgM também têm sido detectados nesta enfermidade (Schmidt et al., 2006).

1.12 Doenças associadas à endometriose

Doenças auto-imunes como tireoidite auto-imune, hipotireoidismo, fibromialgia, síndrome da fadiga crônica, alergias, asma, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren são exemplos de doenças associadas à endometriose. Estes pacientes possuem um risco maior de desenvolver câncer de ovário e possivelmente câncer de mama e de pele (Renner et al., 2006; Schmidt et al., 2006).

1.13 Genes associados à endometriose

Durante mais de 20 anos observou-se uma forte ocorrência familiar de endometriose em parentes de primeiro grau, sustentando um papel genético. Estudos familiares evidenciaram uma maior incidência da doença em parentes de primeiro grau de mulheres afetadas, de 4,3 a 6,9%, do que em parentes de mulheres não afetadas, de 0,6 a 2,0% (Dentillo, 2007; Renner et al., 2006).

A associação entre a doença e os polimorfismos genéticos tem sido reconhecida há muito tempo. Recentemente, os avanços tecnológicos na biologia molecular têm abastecido o interesse nos polimorfismos moleculares e sua influência na suscetibilidade e apresentação clínica das doenças (Tempfer et al., 2009; Ribeiro Júnior, 2009).

A endometriose é uma doença poligênica/multifatorial que

frequentemente resulta em vários problemas ginecológicos incluindo dispareunia, dismenorréia, dor pélvica e infertilidade (Nakata et al., 2004).

Existem provas clínicas que a endometriose pode ser hereditária, porém seus mecanismos não estão claros. No Brasil a incidência relatada em familiares diretos com endometriose é de 8,6% (Yáñez e González, 2008).

Esclarecer a etiologia genética da endometriose implicaria no diagnóstico, na identificação de indivíduos em risco e no desenvolvimento de terapias específicas. Esta desordem tem sido foco de um grande número de estudos associados a investigar uma grande variedade de polimorfismos (Tempfer et al., 2009).

A tecnologia atual permitiu esclarecer a relação entre uma série de fatores secretados e certas deficiências, como as aromatases. Arvanitis et al. (2001) argumentaram que o polimorfismo CYP1A1, CYP19 e GSTM1 aumentam o risco de endometriose, assim como a expressão do oncogene p16, retinoblastoma (pRb) e ciclina D1. Os polimorfismos e as mutações pontuais têm sido associados a defeitos enzimáticos que contribuirão para evolução da endometriose (Yáñez e González, 2008).

O receptor beta de estrógeno (ER β) parece ser um dos fatores mais importantes no mecanismo de ação do estrógeno e alguns estudos têm mostrado associações entre polimorfismos do gene ER β e a progressão da endometriose. Além disso, polimorfismos do gene do PROGINS estão também associados à susceptibilidade para a endometriose, uma vez que a progesterona atua aumentando as células que revestem a parede uterina, acentuando o espessamento do endométrio e fazendo com que ele seja intensamente invadido por vasos sanguíneos. Estudos demonstraram que a secreção anormal de LH, atribuída a polimorfismos na subunidade β do gene, induz a anovulação, maturação prematura do oócito, anormalidades menstruais, síndrome dos ovários policísticos, abortos recorrentes e infertilidade, particularmente aquela relacionada à endometriose (Mafra et al., 2008).

A coexistência de múltiplos alelos em um locus é chamado de polimorfismo genético, ou seja, são sequências de DNA alternativas (alelos) encontrado em uma população na região homóloga do cromossomo, como um gene (Lewin, 2004; Watson et al., 2004). Essas variações genéticas devem ser

encontradas em pelo menos dois alelos que aparecem em mais de 1% dos indivíduos de uma amostra populacional aleatória, enquanto que as mutações constituem as variações presentes em menos de 1% dos indivíduos, sendo mais raras do que os polimorfismos. Tais definições estatísticas são independentes da presença de doença ou da predisposição a condições patológicas (Pasternak, 2007; Thompson e Thompson, 1993). Os polimorfismos são variações genéticas herdadas, presentes em todas as células (germinativas ou somáticas, sadias ou doentes) com prevalência variável em diferentes populações (Gomes et al., 2006).

Um polimorfismo pode ser tanto simples como alternativo, diferença única em pares de bases no mesmo local do cromossomo entre os diferentes membros da população, ou diferenças no comprimento de uma sequência repetida de nucleotídeos simples (Watson et al., 2004).

Uma população pode ter polimorfismo extensivo em nível de genótipo. Muitas variações de sequências podem existir em um determinado locus, algumas delas são evidentes, porque elas afetam o fenótipo, mas outras são escondidas porque não têm nenhum efeito visível. Podendo haver alterações contínuas em um locus, incluindo aquelas que mudam sequência de DNA, mas não muda a sequência da proteína, aquela que a sequência da proteína muda sem mudar a função, aquela que criam proteínas com diferentes atividades e aquela que criam proteínas mutantes que são não-funcionais (Lewin, 2004).

1.14 Marcadores moleculares

1.14.1 Gene Receptor de Estrógeno

O estrógeno regula o metabolismo celular em vários tecidos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das características sexuais secundárias femininas, na reprodução e no metabolismo celular. Essas ações ocorrem através da interação dos hormônios com seus receptores. Duas isoformas da proteína receptora para o estrógeno foram encontradas, denominadas receptor estrogênico α (RE α) e receptor estrogênico β (RE β) (Carvalhosa, 2001).

Inúmeros autores demonstraram a expressão exagerada de receptores

de estrogênio nos implantes de endometriose e também o que parece importante, defeitos no receptor de progesterona. A expressão exagerada de receptores de estrógenos e defeitos no receptor de progesterona são consequência da anormalidade do efeito progestacional sobre o endométrio tópico e ectópico. A maior secreção de colagenases, 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 da sua função podem, portanto, facilitar o aparecimento da moléstia, porque, no sentido amplo, deixa de antagonizar os efeitos proliferativos dos estrogênios (Carvalho et al., 2004).

1.14.2 Gene *p53*

O gene *p53* está localizado no cromossomo 17p13 (braço curto de cromossomo 17 na banda 13) e é um dos mais importantes genes supressores de tumor, controlando a transcrição do DNA e a regulação do ciclo celular. A proteína *p53* induz apoptose ou bloqueia o ciclo celular em resposta a danos no DNA, permitindo que as células lesadas sejam destruídas ou reparadas antes de reiniciarem a síntese de DNA. A inativação funcional das vias *p53* através de eventos genéticos e epigenéticos, que afetam o gene *p53* e/ou seus parceiros de interação, ocorre frequentemente em cânceres. Na verdade, as mutações desse gene estão associadas com a instabilidade no desenvolvimento celular e a progressão do ciclo. Em vários tipos de cânceres são relatadas anormalidades no gene *p53* (Lattuada et al., 2004).

Recentemente tem-se prestado atenção para o possível papel das variantes genéticas do *p53*, em particular o polimorfismo do códon 72 e a endometriose. Este polimorfismo deriva de uma substituição de nucleotídeo único que resulta na presença de uma prolina (*p53*-Pro) ou arginina (*p53*-Arg) na sequência de aminoácidos. O aminoácido modificado afeta as propriedades bioquímicas e funcionais da *p53*: a variante prolina é um forte ativador transcripcional, sendo que a variante arginina é um forte indutor da apoptose (Ammendola et al., 2008; Lattuada et al., 2004; Ribeiro Júnior, 2009).

Um estudo realizado na população chinesa reportou a associação negativa da variante arginina com a endometriose, sugerindo uma ação

protetora do genótipo Arg/Arg contra a doença. A associação foi confirmada em chineses, mas não em populações japonesas (Ammendola et al., 2008).

1.14.3 Polimorfismos de Genes Responsáveis pela Metabolização de Xenobióticos

Os xenobióticos são definidos como compostos estranhos aos sistemas vivos (Rossit et al., 2000). Podem ser compostos tóxicos, tanto de origem natural como antropogênica (Fernandes, 2005). O termo é também aplicado a substâncias presentes em concentrações muito mais elevadas que o nível normal (Cericato, 2009). A raiz da palavra xenobiótica (xeno) provem do grego, significando estranho (xenofilia, xenofobia). Segundo o Aurélio, xenobiótico é muito usado como sinônimo de medicamento, no sentido de substância estranha ao organismo, podendo ser uma substância química natural ou sintética não endógena, estranha ao organismo, mas que foi introduzida no sangue (Simonetti, 2000).

Possivelmente os 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), modulam os níveis de biomarcadores de dano oxidativo (Nakata et al., 2004; Hong, 2002).

O estresse oxidativo pode afetar seriamente a ovulação, a fertilização e a implantação sendo 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 (Yáñez e González, 2008; Nakata et al., 2004).

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 da fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno, por meio das glutathione S-transferase (GSTs), UDP glucoronil transferase e N-acetil transferase (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (Nakata et al., 2004; Rossit, 2000).

Desse modo, diferenças genéticas na regulação, expressão e atividade dos genes de fases I e II podem ser o fator crucial na susceptibilidade a certos tipos de doenças. Polimorfismos em genes do biometabolismo têm sido identificados em inúmeras populações e relacionados com neoplasias de pulmão, infertilidade, fibrose cística, bronquite crônica e endometriose (Linhares, 2005 ; Nakata et al., 2004; Rossit, 2000).

As enzimas pertencentes às famílias GST e citocromo p450 (CYP) estão envolvidas no processo de desintoxicação de alguns pró-carcinogênicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os quais estão presentes na fumaça do cigarro e em certos alimentos. Estas enzimas atuam metabolizando pró-carcinógenos em reativos carcinogênicos intermediários que são subsequentemente catalizados por enzimas como as glutathione S-transferases (GST), na fase II do processo de desintoxicação (Colombo e Raphael, 2009; Hadfield et al., 2001).

Estudos investigam a relação entre a endometriose e os polimorfismos em vários genes envolvidos na detoxificação xenobiótica. Os genes que codificam as enzimas glutathione S-transferase (GST) M1 e T1 e arilamina N-acetiltransferase 2 (NAT2) tem sido estudados pelos dados que sugerem que a exposição à poluentes ambientais, em particular dioxinas, podem estar envolvidos na ativação da doença (Hadfield et al., 2001).

1.14.3.1 Aromatase

Citocromo P450 é o termo genérico utilizado para designar uma família de enzimas que tem a terminologia 450 em sua nomenclatura. As enzimas P450 podem metabolizar uma série de substratos. Distintas enzimas P450 são identificadas no processo de esteroidogênese: P450_{scc} faz a clivagem do colesterol; P450_{c11} mediando a 11-hidroxilase e a 18-hidroxilase; P450_{c17}

mediando a 17-hidroxilase; P450c21 mediando a 21-hidroxilase; e a P450arom intermediando a aromatização de androgênios em estrogênios (Riachi, 2008).

A formação de estrógeno (estrona e estradiol) a partir de esteróides do C19 é catalisada por uma específica fração da P450 chamada de aromatase P450, um produto de gene CYP 19. O gene CYP 19 humano localizado no cromossomo 15q21.2 é formado por 123 kilobases (kb) e compreende 9 éxons codificadores (éxons II - X) que são comuns a outras isoformas da citocromo p450 (Riachi, 2008).

A expressão aberrante da aromatase citocromo p450 tem sido descritas no endométrio eutópico e ectópico de algumas mulheres com endometriose. Esta enzima é responsável por catalisar a conversão de androstenediona em estrona em determinados tecidos humanos. Devido ao caráter hormônio-dependente da doença, a presença de aromatase e a consequente produção local de estrogênio contribui de forma importante para o estabelecimento da doença, sendo que no endométrio de mulheres saudáveis os níveis de aromatase p450 não são detectáveis (Riachi, 2008; Velasco et al., 2006).

A superfamília de genes do citocromo P450 codifica numerosas enzimas que catalisam uma variedade de reações químicas que metabolizam um grande número de substratos exógenos e endógenos, como lipídeos e esteróides. Consequentemente, é considerado o sistema biológico de metabolização mais versátil conhecido, sendo encontrado em procaríotos e eucaríotos. Presume-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, todos desta superfamília evoluíram a partir de um ancestral comum, há cerca de dois bilhões e meio de anos (Guembarovski, 2007).

Divididas em famílias denominadas: CYP1, CYP2 e CYP3, as frequências das variantes alélicas da superfamília CYP diferem entre as etnias e, até o momento, as que parecem mais relevantes para a carcinogênese são as que envolvem os genes CYP1A1, CYP2E1 e CYP2D6. O CYP1A1 é considerado um gene chave no metabolismo de carcinógenos, constituindo-se num biomarcador de suscetibilidade ao câncer, particularmente naqueles tumores ligados ao hábito tabagista (Guembarovski, 2007).

Em relação às enzimas CYPs, uma das mais extensivamente estudada é a CYP1A1. A expressão de CYP1A1 é induzida por HPA, e o produto gênico é

responsável pelo primeiro passo de ativação de HPA. A transição de timina a citosina, na base 264, abaixo do sítio de poliadenilação de CYP1A1, gera um sítio de restrição para a enzima Msp1 e confere aumento da atividade catalítica do gene. Outro polimorfismo caracteriza-se pela transição da adenina pela citosina, gerando a substituição do aminoácido isoleucina pela valina (Colombo e Raphael, 2009 ; Nakata et al., 2004; Arvanits, 2001).

1.14.3.2 Gene Glutathione S-Transferase (GST)

Muitos dos substratos GST são xenobióticos e diferentes classes de enzimas são específicas para diferentes substratos. Os estudos publicados visando à identificação de suscetibilidade genética à endometriose e os polimorfismos do gene glutathione S-transferase (GST) GSTM1 e GSTT1 são os mais estudados e parecem ser importantes na desintoxicação dos produtos do estresse oxidativo (Guo, 2005; Hadfield et al., 2001).

As Glutathione S-transferases (GSTs) correspondem a uma superfamília envolvida na fase II e protegem a célula contra metabólitos endógenos e exógenos através da conjugação da glutathione endógena com compostos eletrofílicos, desativando assim sua citotoxicidade. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos incluindo carcinógenos ambientais, espécies reativas de oxigênio e agentes terapêuticos (Kvitko et al., 2008; Hadfield et al., 2001).

O gene GSTM1 localizado no cromossomo 1p13.3, codifica enzimas da classe GST mu (μ), está presente em dois alelos ativos: GSTM1 * A, GSTM1 * B e um alelo nulo (GSTM1 * 0). Sua combinação corresponde aos genótipos ativos GSTM1A / A ou A / 0; GSTM1B / B ou B / 0 e GSTM1A / B e um genótipo não ativo, GSTM10 / 0, que não possui mRNA ou produto da proteína devido a uma deleção estendida (10Kb). Os homocigotos para o alelo GSTM1 nulo são considerados grupos de riscos, principalmente se expostos a elevados níveis de carcinógenos e compostos químicos, devido ao defeito enzimático em seu sistema de detoxificação. Assim como o gene GSTM1, o GSTT1, localizado no cromossomo 22q11.2, codifica a enzima da classe theta (θ) e também é polimórfico na população humana, podendo apresentar genótipo nulo por deleção. Porém existem controvérsias em torno da associação

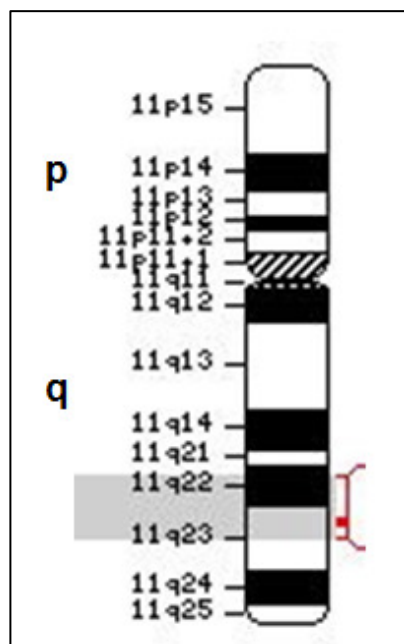
GSTM1/GSTT1 e a endometriose (Guo, 2005; Nakata et al., 2004; Baranova et al., 1997).

Estudos mostram que a enzima GSTM1 ativa é responsável pela detoxificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes no cigarro em solventes como o benzeno, enquanto que a GSTT1 detoxifica pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (Kvitko et al., 2008).

1.14.4 Gene Receptor de Progesterona

O receptor de progesterona é um receptor esteróide chave na regulação do crescimento da mama, lactação, ciclo menstrual, gravidez, suporte da gestação e embriogênese. Em humanos a progesterona possui papel fundamental na manutenção do endométrio e desenvolvimento alveolar lobular durante o ciclo menstrual feminino e gravidez (Nunes, 2006).

O gene do receptor de progesterona (PR) em humanos é único e localiza-se no braço longo do cromossomo 11, nas bandas 22-23 (11q22-23) (Figura 6), sendo responsável pela produção de duas isoformas protéicas: PR-A e PR-B (Gomes et al., 2006).



Cromossomo 11

Figura 6: Posição relativa ao PR, braço longo do cromossomo 11, nas bandas 22-23 (11q22-23). Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2010.

As ações fisiológicas da progesterona são mediadas pelas duas isoformas de seu receptor, respectivamente A com 79 kDa e B com 109 kDa. Em seres humanos os dois RNAs transcritos são gerados a partir de um único gene que tem, porém, regiões promotoras diferentes. Estruturalmente, as proteínas diferem apenas quanto à presença de 165 aminoácidos na região N-terminal do receptor B (Seniski, 2008; Pooley et al., 2006; Carvalho et al., 2004; De Vivo et al., 2002). As demais regiões são idênticas em ambas as proteínas e consistem em um domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio terminal de interação com o ligante (LDB) e uma região tipo “dobradiça” entre DBD e LDB (Figura 7) (Giacomazzi, 2008).

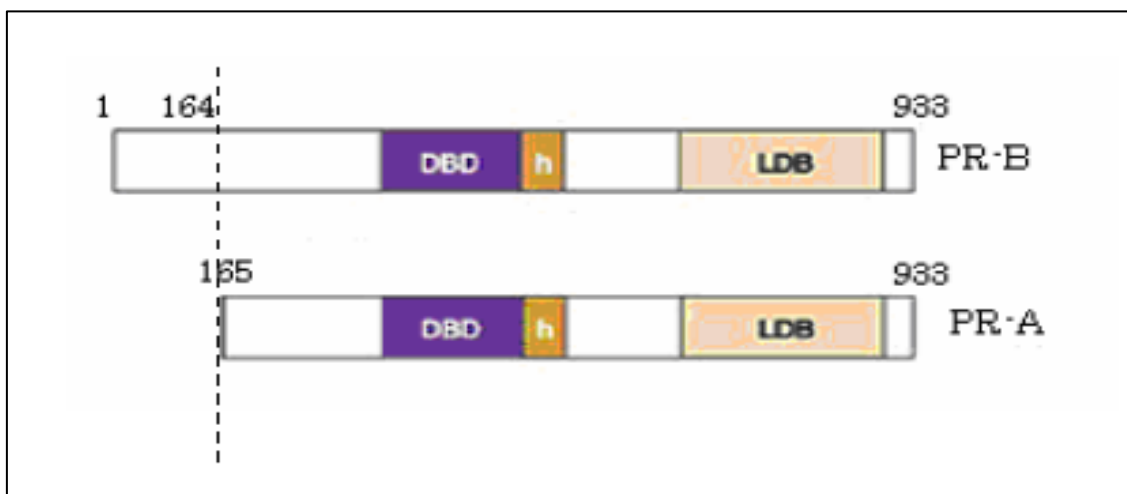


Figura 7: Estrutura das isoformas PR-A e PR-B do receptor de progesterona, sendo DBD o domínio de ligação, LDB o domínio terminal de interação com o ligante e h é uma região tipo “dobradiça” entre DBD e LDB.

Fonte: Giacomazzi, 2008.

Em tecidos normais, as células expressam as duas isoformas em níveis equivalentes. Nos tumores, há a predominância da expressão de uma isoforma, geralmente a PR-A. As anormalidades reprodutoras e no desempenho sexual normalmente estão ligadas ao PR-A, atuando como inibidor do PR-B (Seniski, 2008; Nunes, 2006).

No endométrio ambos os subtipos do receptor de progesterona são expressos, e a sua concentração varia de acordo com a fase do ciclo menstrual. Os efeitos antiproliferativos da progesterona sobre o endométrio são mediados principalmente pela isoforma A do receptor de progesterona. A ativação da isoforma B, na ausência do receptor tipo A, leva a aumento da

proliferação no epitélio. Portanto, havendo a predominância da isoforma B, não há adequada ação da progesterona, especulando-se desse modo, que talvez essa alteração esteja relacionada à gênese da endometriose (Carvalho et al., 2004; De Vivo et al., 2002).

Inúmeras investigações atuais têm enfoque nos efeitos do receptor de progesterona no endométrio. O receptor de progesterona B (PR-B) prevalece nas células epiteliais endometriais e o receptor de progesterona A (PR-A) no estroma. A progesterona também reverte o crescimento estimulado pelos estrógenos, especificamente nas células do estroma e diminui a quantidade de receptores de estrógeno (Yáñez e González, 2008).

A perda da heterozigotidade da região cromossomal 11q22-23, onde o gene PR está localizado, foi frequentemente observada em alguns tipos de câncer, e existem evidências que ele pode ter propriedades supressoras de tumor (Fajani et al., 2002; Manolitsas et al., 1997).

1.14.4.1 Polimorfismo do Gene Receptor de Progesterona (PROGINS)

O polimorfismo PROGINS é um complexo de três alterações genéticas encontradas apenas em humanos. Este polimorfismo foi primeiramente descrito como uma inserção da subfamília *Alu* de 306 pb no íntron G entre os exons 7 e 8, região codificante do domínio de ligação hormonal do gene receptor de progesterona humano (Donaldson 2002; Manolitsas et al., 1997). Essa inserção levaria à transcrição anômala do gene, codificando uma forma variante do éxon 8. A codificação de um éxon alternativo, por sua vez, resultaria em perda da capacidade de ligação do hormônio ao receptor e da sua subsequente ativação, com queda da atividade final mediada pela progesterona (Gomes et al., 2006). O polimorfismo PROGINS também é marcado por uma mutação *missense* (substituição de um aminoácido por outro provocando a alteração da sequência da proteína) de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no exon 4 e uma mutação silenciosa (substituições de bases não alteram a sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica) SNP no exon 5. A prevalência é alta (aproximadamente 15% em caucasianos) e modula o risco de várias desordens ginecológicas (Rocha, 2007; Romano et al., 2007; Pearce et al., 2005; Modugno, 2004).

Acredita-se que a mutação *missense* seja causada pela inserção do elemento móvel *Alu* no intron G do PR, levando à substituição de uma Guanina para Timina, Val660Leu no éxon 4, causando a troca da valina pela leucina no ponto principal do PR no códon 660. Semelhante substituição da citosina pela timina, His770His no éxon 5, causa uma mutação silenciosa de uma histidina por uma histidina no códon 770 e há relatos em que é reportada com a inserção do elemento *Alu*. Esse complexo polimorfismo genético funcional denomina-se PROGINS (Giacomazzi, 2008; Linhares et al., 2005) (Figura 8).

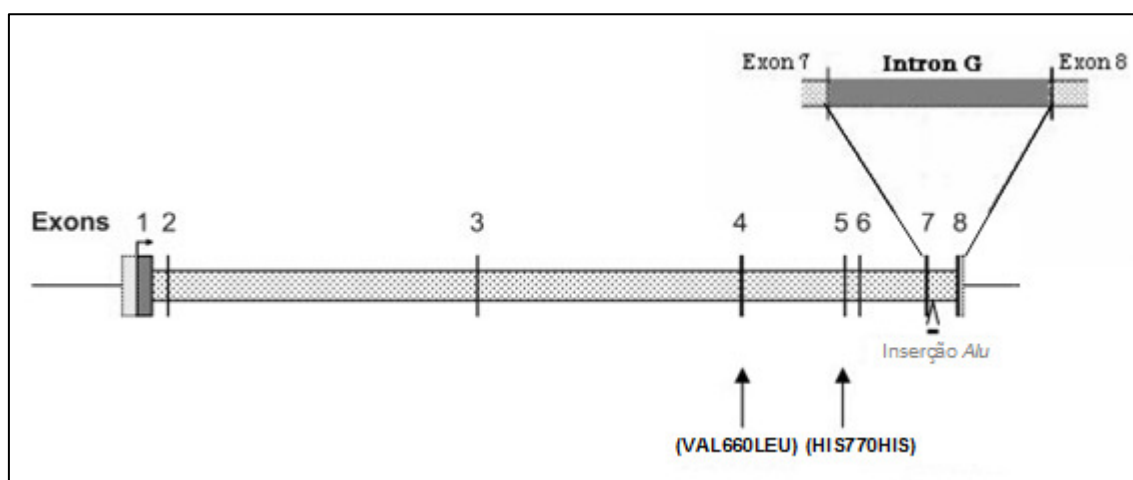


Figura 8: Localização da inserção *Alu* que caracteriza o complexo polimórfico PROGINS.
Fonte: Figura modificada de Treloar et al., 2005.

Considerando as consequências possíveis das três alterações PROGINS, somente a inserção de *Alu* e a substituição dos aminoácidos Val660Leu são susceptíveis a afetar a função do receptor. Além disso, a mutação silenciosa (His770His) não deve alterar as propriedades da proteína PR (Romano et al., 2007).

Rowe et al. (1995) observaram alterações fenotípicas decorrentes dos polimorfismos do gene desse receptor. O polimorfismo PROGINS tem sido estudado em associação com doenças que possuem relação com níveis de estrogênio (estrogênio-dependente) (De Vivo, 2003; Kurz, 2001).

O elemento *Alu* dentro do genoma humano é aquele com maior poder de mobilidade, existindo aproximadamente 1.200.000 cópias desse elemento. Cada repetição do *Alu* tem aproximadamente 300 nucleotídeos em seu comprimento (Linhares et al., 2005). As Sequência *Alu* replicam-se ocasionalmente e a cópia resultante insere-se aleatoriamente em uma nova

posição do cromossomo original ou de outro cromossomo, em geral em uma localização que não exerce efeito sobre o funcionamento dos genes próximos. Cada inserção é um evento único, e uma vez inserida, a sequência de *Alu* permanece no genoma, sendo transmitida aos seus descendentes (Giacomazzi, 2008).

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 de progesterona, seja qualquer uma das mencionadas acima, contribui para o surgimento de doenças em tecidos hormônios dependentes, inclusive na endometriose (Giordano, 1988)

A isoforma "A" do receptor de progesterona é a proteína envolvida com o PROGINS; tal polimorfismo levará a um decréscimo de sua estabilidade, fazendo com que esta perca a sua capacidade de inibir a ativação dos receptores estrogênicos, causando inadequado controle desses receptores. Acredita-se que a isoforma "A", sob ação do polimorfismo, levaria também a uma maior expressão da isoforma "B" (responsável pela ativação dos receptores estrogênicos), contribuindo para aumento da ação oncogênica do PROGINS (Linhares, 2005).

O alelo selvagem do gene PR é denominado A1 e o alelo polimórfico PROGINS, denominado A2. Mulheres com o alelo A2 apresentam aumento do risco de desenvolverem patologias nos tecidos onde a exposição à progesterona tem efeito de proteção, como no ovário e no endométrio (Giacomazzi, 2008).

Estudos que compararam 21 grupos étnicos humanos diferentes verificaram que a frequência da variante polimórfica PROGINS (A1A2 + A2A2) é bastante diversa em distintos grupos étnicos, sendo maior em gregos (22%) e nula em africanos (0%) (Giacomazzi, 2008; Gomes et al., 2006).

Neste estudo iremos avaliar a distribuição da frequência dos genótipos do PROGINS em mulheres com endometriose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar o polimorfismo do gene receptor de progesterona nos grupos de mulheres com diagnóstico de endometriose e no grupo controle.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência dos genótipos (A1/A1, A1/A2 ou A2/A2) do polimorfismo do PROGINS nas pacientes com endometriose e no grupo controle;
- Analisar a associação entre o polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) e os diferentes graus de endometriose, fertilidade e infertilidade;
- Pesquisar a correlação entre cor da pele, tabagismo, consumo de bebida alcoólica, uso de contraceptivos e prática de atividade física com os diferentes genótipos do polimorfismo PROGINS;
- Analisar a associação entre o polimorfismo PROGINS e *p53*.

3. JUSTIFICATIVAS

Nas últimas décadas ocorreu um aumento significativo no número de pacientes inférteis com endometriose. Essa constatação pode representar apenas o aumento na prevalência desta enfermidade na população feminina ou, simplesmente, a melhora da investigação diagnóstica do casal infértil, sobretudo com o desenvolvimento da videolaparoscopia como instrumento diagnóstico fundamental desta patologia (Abrão, 2000).

Na literatura, a incidência de endometriose nas mulheres com infertilidade varia de 6% a 58% (Wheeler, 1989; Hasson, 1976), ao passo que 30 a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (Thomas, 1993; Fedelle et al., 1992).

Por afetar mulheres na idade reprodutiva, fase importante de relações pessoais e profissionais, a ocorrência da endometriose compromete a qualidade física e emocional, determinada pelos sintomas da doença, como dismenorréia, dispareunia e infertilidade. O tempo médio estimado para que se faça o diagnóstico gira em torno de sete anos. Como a doença possui um caráter progressivo, este tempo determinará também um comprometimento na capacidade de engravidar (Valadares, 2006).

A endometriose tem sido relacionada, como já relatado anteriormente, com alterações genéticas. Polimorfismos nos genes p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1 e no receptor de progesterona foram correlacionados com a endometriose e com o grau de severidade da doença (Hsieh, 2006; Nakata, 2004; Carvalho et al., 2004).

Este estudo visa comparar dois grupos de pacientes portadoras de endometriose, férteis e inférteis, com o grupo controle quanto a frequência dos genótipos do marcador molecular PROGINS para investigar se há diferença significativa destes nos dois grupos em comparação ao grupo controle.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Analisou-se o DNA de amostras de sangue periférico (15 mL) de 99 pacientes para o polimorfismo do PROGINS. As amostras de sangue periférico foram coletadas no Laboratório Replicon da PUC Goiás e o critério de inclusão utilizado foram os sinais e sintomas sugestivos de endometriose nas pacientes, tais como dismenorréia progressiva, dispareunia, dor pélvica, infertilidade ou ecografia com laudo sugestivo de endometriose. O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e as pacientes responderam ainda a um questionário sobre os hábitos sociais (ANEXO I) e assinaram ao TCLE (ANEXO II e III).

As amostras de sangue, por sua vez, foram subdivididas em dois grupos, caso e controle, de acordo com a presença ou ausência da endometriose. No grupo caso com endometriose foram incluídas 54 pacientes provenientes de um centro de referência em laparoscopia e infertilidade de Goiânia (FÉRTILE) com sinais e sintomas sugestivos de endometriose diagnosticados através de videolaparoscopia. Esse grupo foi subdividido em pacientes com endometriose férteis e pacientes com endometriose inférteis. O grupo controle foi composto por 45 mulheres com ausência de endometriose por anamnese.

As pacientes do grupo endometriose foram subdivididas baseadas nos dados coletados no questionário em anexo.

O grupo I (Endo+Inf) está representado por pacientes inférteis (paciente com relato de tentativa de gravidez por pelo menos 1 ano);

O grupo II (Endo+Fert) está representado por pacientes com outras queixas e que tenham pelo menos um filho sem relato de dificuldade para engravidar.

Os fatores de exclusão iniciais foram: 1) aquelas pacientes submetidas a salpingectomia (fator tubário); 2) parceiro com dois espermogramas comprometidos (fator masculino); 3) Anovulia persistente diagnosticada pela ecografia (fator ovariano) e 4) Teste pós-coito anormal (fator cervical).

Quanto ao grau de endometriose, as pacientes foram classificadas como: grau I (mínimo), grau II (leve), grau III (moderado) e grau IV (severo).

4.2 Extração de DNA genômico

As amostras de DNA foram extraídas do sangue periférico no Laboratório do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Para extração de DNA genômico foi utilizado o kit Illustra GFX™ (*GE Healthcare, USA*). A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, USA*).

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR, foi realizada com volume final de 25µL para identificar o polimorfismo do gene PROGINS, cuja acurácia do primer é de 100% (ANEXO IV). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% em solução Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. Os géis foram corados com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizados no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA*).

Na tabela I foram observadas as sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) utilizados para a amplificação da região que contém o polimorfismo PROGINS no intron G do gene do receptor de progesterona (Carvalho et al., 2004).

Tabela I - Sequência dos *primers* do PROGINS e tamanho esperado dos fragmentos.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto
PROGINS forward (F)	GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A	149 pb e 455 pb
PROGINS reverse (R)	AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC	

Fonte: Carvalho et al., 2004

A amplificação da região do gene do receptor de progesterona a ser estudada pode gerar dois produtos de PCR distintos. Um, denominado A1, de

149 pb, se refere ao alelo selvagem, ou seja, sem inserção *Alu*, e outro, denominado A2, de 455 pb, resultado da inserção de 306 pb no intron G do gene do receptor. Desta forma, cada paciente ao ser submetida à análise dos dois alelos, pode ser considerada homocigota para a forma selvagem (A1/A1) ou polimórfica (A2/A2) e heterocigota, contendo um alelo de cada tipo (A1/A2) (Figura 9).

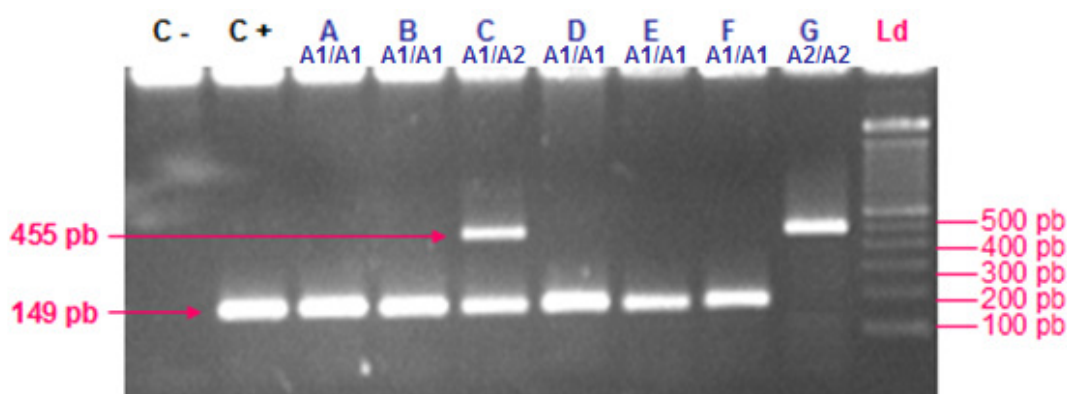


Figura 9: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os possíveis genótipos para o polimorfismo PROGINs. A linha Ld contém o marcador de peso molecular *100-pb DNA ladder* (Fermentas). As linhas C- e C+ representam os controles negativo da reação de PCR e positivo A1/A1 do gene receptor de progesterona respectivamente. As linhas de A-G representam a amplificação da região que flanqueia o polimorfismo PROGINs do receptor de progesterona, em amostras que contêm os genótipos: homocigoto selvagem A1/A1 (149 pb), heterocigoto A1/A2 (149 pb e 455 pb [=149 pb+inserção *Alu* de 306 pb]) e homocigoto polimórfico A2/A2 (455 pb), respectivamente.

O protocolo utilizado para amplificação do polimorfismo do PROGINs foi especificado na tabela II e o protocolo de termociclagem especificado na tabela III.

Tabela II - Protocolo para a amplificação do polimorfismo do PROGINs para PCR.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 mM	2,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer sense	0,02 mM	0,5 µL
Primer antisense	0,02 mM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	15,3 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela III - Protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers* PROGINS para técnica de PCR.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	55°C	1	35
Polimerização	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

As amostras de DNA também foram submetidas à amplificação gene *p53* por PCR.

O produto obtido por cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% para *p53*, em um campo elétrico de 10 V/cm 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 VD®* - *Amersham Pharmacia Biotech*, EUA) (Ribeiro Júnior, 2009).

Nas tabelas IV e V observamos as sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*) utilizadas para a amplificação da região que contém o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* (Ribeiro Júnior, 2009).

Tabela IV – Sequência dos *primers p53-PRO* e tamanho esperado dos fragmentos.

<i>Primer p53-PRO</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto
Forward (F)	GCC AGA GGC TGC TCC CCC	177 pb
Reverse (R)	CGT GCA AGT CAC AGA CTT	

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

Tabela V – Sequência dos *primers p53-ARG* e tamanho esperado dos fragmentos.

<i>Primer p53-ARG</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto
Forward (F)	TCC CCC TTG CCG TCC CAA	141 pb
Reverse (R)	CTG GTG CAG GGG CCA CGC	

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

A amplificação do polimorfismo no códon 72 do gene *p53* a ser

estudada pode gerar dois produtos de PCR distintos: um produto de 141 pb que resulta na presença de arginina (Arg), e outro com 177 pb que resulta na presença de prolina (Pro). Desta forma cada paciente, ao analisarmos os dois alelos, pode ser considerada homocigota para arginina (Arg/Arg) ou para prolina (Pro/Pro) e heterocigota, contendo um alelo de cada tipo (Arg/Pro) (Figura 10).

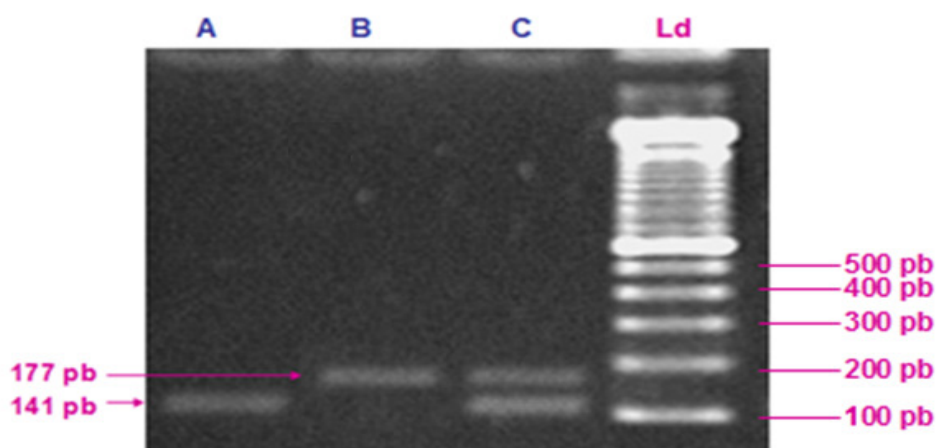


Figura 10: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os possíveis genótipos para o polimorfismo no códon 72 do gene p53. A linha Ld contém o marcador de peso molecular 100-pb DNA ladder (Fermentas). As linhas de A-C representam a amplificação da região que flanqueia o polimorfismo no códon 72 do gene p53, em amostras que contêm os genótipos: homocigoto Arg/Arg (141 pb), heterocigoto Arg/Pro (141 pb e 177 pb) e homocigoto Pro/Pro (177 pb), respectivamente.

Nas tabelas VI e VII temos os protocolos utilizados para amplificação do polimorfismo no códon 72 do p53 e, nas tabelas VIII e IX, os protocolos de termociclagem.

Tabela VI - Protocolo para a amplificação do polimorfismo no códon 72 do p53-PRO.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 mM	2,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer sense	0,02 mM	0,5 µL
Primer antisense	0,02 mM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	15,3 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela VII - Protocolo para a amplificação do polimorfismo no códon 72 do *p53*-ARG.

REAGENTES	□ UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer sense	0,02 mM	0,5 µL
Primer antisense	0,02 mM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	15,8 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Tabela VIII - Protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers p53*-PRO.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	57°C	1	35
Polimerização	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

Tabela IX - Protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers p53*-ARG.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	59°C	1	35
Polimerização	70°C	1	
Extensão final	70°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

4.4 Análise dos resultados

Os resultados foram tabulados em planilha Excel, formando um banco de dados. Foi utilizada análise estatística do Teste U de Mann-Whitney, Qui-

Quadrado, Exato de Fisher e ODDS RATIO para a relação de marcador/polimorfismo e alteração patológica. Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do *software* Bioestat versão 5.0 (Ayres et al., 2007).

5. RESULTADOS ENCONTRADOS

Das 99 amostras analisadas, o grupo de pacientes com endometriose (n=54) apresentou idade média de 32,5 anos com desvio padrão (DP) de $\pm 2,9$ anos e o grupo controle (n=45) apresentou idade média de 37,6 anos e DP de $\pm 11,0$ anos.

O teste U de Mann Whitney indicou que a diferença entre as idades dos grupos endometriose e controle é estatisticamente significativa ($P = 0,0037$) (tabela X).

Tabela X – Comparação entre as idades dos grupos de pacientes com endometriose e controle.

Grupo	Idade média	DP	P^a
Endometriose (n=54)	32,5	2,9	0,0037
Controle (n=45)	37,6	11,0	

^a Valor de P do teste U de Mann Whitney.

Ao analisarmos a distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS do grupo com endometriose (n=54) obtivemos 66,7% (36/54) das pacientes com o genótipo A1/A1 e 33,3% (18/54) com genótipos polimórficos para PROGINS (A1/A2+A2/A2). No grupo controle (n=45) 84,5% (38/45) apresentam o genótipo A1/A1 e 15,5% (7/45) os genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) (Tabela XI) (Figura 11).

A frequência do polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2) foi duas vezes maior no grupo que apresenta endometriose do que no grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0426$). O teste apresentou alta especificidade (84%) (ANEXO V).

Tabela XI – Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose e controle.

	A1/A1		A1/A2+A2/A2		P^a
	n	%	n	%	
Endometriose (n=54)	36	66,7	18	33,3	0,0426
Controle (n=45)	38	84,5	7	15,5	

^a Valor de P do teste Qui-Quadrado

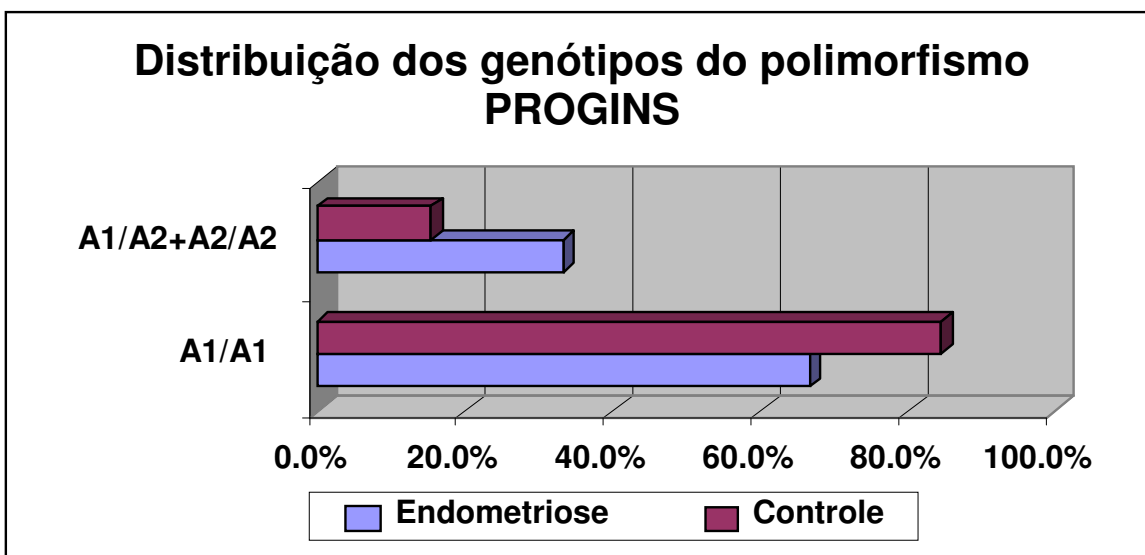


Figura 11: Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose e controle.

Ao analisarmos as frequências genóticas do PROGINS com a classificação da endometriose grau I/II ou grau III/IV do grupo endometriose, verificamos que 68,2% (15/22) das pacientes com endometriose grau I/II (n=22) apresentaram genótipo A1/A1 e 31,8% (7/22) apresentaram os genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2). Nas pacientes com endometriose grau III/IV (n=29), observamos 69,0% (20/29) com o genótipo A1/A1 e 31,0% (9/29) com os genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2).

Quando compararmos as pacientes dos grupos endometriose grau I/II e endometriose grau III/IV em relação a sua distribuição genotípica, não verificamos diferença estatística significativa entre estes grupos ($P = 0,9524$), conforme tabela XII. Três pacientes com endometriose não informaram sua classificação quanto ao grau de endometriose.

Tabela XII – Distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS correlacionada com a classificação da endometriose (Grau I/II) ou (Grau III/IV) e grupo controle.

	A1/A1		A1/A2+A2/A2		P^a
	n	%	n	%	
Endo Grau I/II (n=22)	15	68,2	7	31,8	0,9524
Endo Grau III/IV (n=29)	20	69,0	9	31,0	

^a Valor de P do teste Qui-Quadrado

Ao analisarmos a correlação entre a classificação do grau de

endometriose (I/II ou III/IV) com a presença ou ausência de fertilidade verificamos que dentre as 22 pacientes que apresentaram grau I ou II de endometriose, 50,0% (11/22) são férteis e 50,0% (11/22) apresentavam infertilidade. Das 29 pacientes com endometriose que apresentam grau III ou IV, 55,2% (16/29) apresentavam infertilidade e 44,8% (13/29) eram férteis. Três pacientes do grupo endometriose não informaram quanto ao item fertilidade. A diferença entre a presença ou ausência de fertilidade e o grau de endometriose não foi estatisticamente significativa ($P = 0,7816$) (tabela XIII).

Tabela XIII – Correlação entre a presença ou ausência de fertilidade e o grau de endometriose.

Classificação	Endo + Inf		Endo + Fert		P^a
	n	%	n	%	
Endo Grau I/II (n=22)	11	50,0	11	50,0	0,7816
Endo Grau III/IV (n=29)	16	55,2	13	44,8	

^a Valor de P do Teste Exato de Fisher.

Na tabela XIV analisamos a distribuição genotípica do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil e endometriose fértil. Dentre as pacientes do grupo endometriose infértil (n=27), 70,4% (19/27) apresentaram o genótipo A1/A1 e 29,6% (8/27) os genótipos polimórficos A1/A2+A2/A2. Observamos que dentre as pacientes do grupo endometriose fértil (n=25), 68,0% (17/25) apresentaram o genótipo A1/A1 e 32,0% (8/25) os genótipos polimórficos A1/A2+A2/A2. Duas pacientes do grupo endometriose não informaram quanto ao item fertilidade. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos endometriose fértil e infértil em relação ao polimorfismo PROGINS ($P = 0,8532$).

Tabela XIV – Distribuição dos genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 do polimorfismo PROGINS nas pacientes com endometriose férteis (Grupo I) e inférteis (Grupo II).

	A1/A1		A1/A2+A2/A2		P^a
	n	%	n	%	
Endo + Inf (n=27)	19	70,4	8	29,6	0,8532
Endo + Fert (n=25)	17	68,0	8	32,0	

^a Valor de P do teste Qui-Quadrado

Na tabela XV comparamos a correlação entre os genótipos do polimorfismo PROGINs das pacientes do grupo endometriose com as variáveis queixa principal, período em que a paciente queixava-se de dor e sangramento e a intensidade da dor pélvica.

Dentre as pacientes com genótipo A1/A1 do grupo endometriose (n=35), 45,7% (16/35) queixavam-se de dor e infertilidade, 8,6% (3/35) dor, infertilidade e sangramento, 28,6% (10/35) eram férteis e queixavam-se de dor e 17,1% (6/35) eram férteis, tinham dor e sangravam. Das pacientes do grupo endometriose com genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) (n=16), 37,5% (6/16) queixavam-se de dor e infertilidade, 12,5 (2/16) dor, infertilidade e sangramento, 31,2% (5/16) tinham dor e eram férteis e 18,8% (3/16) eram férteis e tinham dor e sangramento. A diferença entre as frequências dos genótipos do polimorfismo PROGINs e a queixa principal das pacientes não foi estatisticamente significativa ($P = 0,9428$).

Tabela XV - Correlação entre os genótipos do polimorfismo PROGINs das pacientes do grupo endometriose e as variáveis: queixa principal, período de dor e sangramento e intensidade da dor pélvica.

Genótipo	A1/A1		A1/A2 + A2/A2		P^a
	n	%	n	%	
Queixa principal					
Endo+Inf+Dor	16	45,7	6	37,5	0,9428
Endo+Inf+Dor+Sangr	3	8,6	2	12,5	
Endo+Fert+Dor	10	28,6	5	31,2	
Endo+Fert+Dor+Sangr	6	17,1	3	18,8	
Total	35	100,0	16	100,0	
Dor/Sangr- Período					
Peri-menstrual	19	54,3	9	56,2	0,8959
Ciclo todo	16	45,7	7	43,8	
Total	35	100,0	16	100,0	
Dor pélvica					
Leve ou Mod	21	60,0	9	56,2	0,8007
Intensa	14	40,0	7	43,8	
Total	35	100,0	16	100,0	

^a Valor de P do teste Qui-Quadrado

Com relação à periodicidade dos sintomas, 54,3% (19/35) das pacientes com endometriose e genótipo A1/A1 (n=35) sentiam dor e sangravam no período peri-menstrual e 45,7% (16/35) tinham essas queixas durante todo o ciclo. Das pacientes que apresentaram genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) (n=16), 56,2% (9/16) queixaram-se de dor e sangramento no período peri-menstrual e 43,8% (7/16) durante o ciclo todo. A diferença entre as frequências dos genótipos polimórficos e o período em que as pacientes queixavam-se de dor e sangramento não foi estatisticamente significativa ($P = 0,8959$).

Em relação à intensidade da dor pélvica do grupo endometriose, 60,0% (21/35) das pacientes com genótipo A1/A1 (n=35) apresentaram dor pélvica leve ou moderada e 40,0% (14/35) apresentaram dor intensa. Das pacientes com genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) (n=16), 56,2% (9/16) queixaram-se de dor leve ou moderada e 43,8% (7/16) de dor intensa. Não encontramos diferença estatística significativa entre as frequências dos genótipos do polimorfismo PROGINS e a intensidade da dor pélvica ($P = 0,8007$).

A tabela XVI mostra os dados correspondentes aos hábitos sociais e cor de pele pelas pacientes dos dois grupos (controle e endometriose). Em relação à cor de pele, foi verificado 86,5% (45/52) das pacientes com endometriose (n=52) relatando cor branca e 13,5% (7/52) relatando cor negra. Já no grupo controle (n=32), 84,4% (27/32) relataram cor branca e 15,6% (5/32) cor negra. A diferença entre o grupo endometriose e controle em relação à cor de pele não foi estatisticamente significativa, sendo $P = 0,7832$ e $OR = 1,1905$ (0,3435 a 4,1257). Duas pacientes do grupo endometriose não responderam ao questionário e treze pacientes do grupo controle não responderam quanto ao item cor de pele.

Em relação à prática de esportes, 61,5% (32/52) das pacientes com endometriose (n=52) relataram praticar atividade física enquanto 38,5% (20/52) relataram não praticar esportes nenhum. No grupo controle (n=45), 64,4% (29/45) praticam exercícios físicos e 35,6% (16/45) não praticam. A diferença entre as pacientes com endometriose e o grupo controle em relação à atividade física, não foi estatisticamente significativa, sendo o valor de $P = 0,7677$ e $OR = 0,8828$ (0,3859 a 2,0193).

Com relação ao tabagismo, 5,8% (3/52) das pacientes do grupo com

endometriose (n=52) são fumantes e 94,2% (49/52) não fumam. No grupo controle (n=45) 6,7% (3/45) relataram a prática deste hábito social e 93,3% (42/45) não praticam este hábito. A diferença das frequências de fumantes, entre o grupo endometriose e o controle não foi estatisticamente significativa, sendo $P = 0,8106$ e $OR = 0,8571$ (0,1642 a 4,4745).

Tabela XVI – Correlação entre as variáveis estudadas e os grupos endometriose e controle.

Grupos Variáveis	Endometriose		Controle		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
* Cor:								
Branca	45	86,5	27	84,4				
Negra	7	13,5	5	15,6	0,7832	1,1905	0,3435	4,1257
Total	52	100,0	32	100,0				
Atividade física:								
Pratica	32	61,5	29	64,4				
Não pratica	20	38,5	16	35,6	0,7677	0,8828	0,3859	2,0193
Total	52	100,0	45	100,0				
Fumo:								
Sim	3	5,8	3	6,7				
Não	49	94,2	42	93,3	0,8106	0,8571	0,1642	4,4745
Total	52	100,0	45	100,0				
Bebida Alcoólica:								
Sim	5	9,6	12	26,7				
Não	47	90,4	33	73,3	0,0276	0,2926	0,0941	0,9095
Total	52	100,0	45	100,0				
Anticoncepcional:								
Usa	15	28,8	16	35,6				
Não usa	37	71,2	29	64,4	0,4798	0,7348	0,3122	1,7293
Total	52	100,0	45	100,0				

* Informada pelo paciente

^a Valor de P do teste Qui-Quadrado

Dentre as pacientes com endometriose (n=52) 9,6% (5/52) relataram ingerir bebida alcoólica e 90,4% (47/52) não ingerir. No grupo controle (n=45) 26,7% (12/45) relataram ingerir bebidas alcoólicas e 73,3% (33/45) relataram a não ingestão. Houve diferença estatística significativa entre os grupos controle

e endometriose com relação ao hábito de ingerir bebida alcoólica, porém tal não parece estar relacionado com o desenvolvimento da endometriose ($P = 0,0276$ e $OR = 0,2926$ (0,0941 a 0,9095)).

Quanto ao uso de anticoncepcional, 28,8% (15/52) das pacientes com endometriose (n=52) usavam contraceptivos e 71,2% (37/52) não faziam uso. No grupo controle (n=45) 35,6% (16/45) faziam uso de contraceptivo e 64,4% (29/45) não utilizavam. Sendo $P = 0,4798$ e $OR = 0,7348$ (0,3122 a 1,7293), a diferença das pacientes com endometriose e do grupo controle quanto ao uso de anticoncepcionais, não foi estatisticamente significativa.

Na tabela XVII foi feita a comparação da variável cor da pele com os genótipos do polimorfismo PROGINS nas pacientes com endometriose férteis, endometriose inférteis e grupo controle. Duas pacientes com endometriose não responderam ao questionário socioeconômico, impossibilitando sua classificação quanto a fertilidade e cor de pele, e uma paciente não informou quanto ao item cor da pele. Treze pacientes do grupo controle não informaram quanto ao item cor da pele.

Entre as pacientes inférteis com endometriose que relataram ter cor de pele branca (n=22), 72,7% (16/22) apresentaram o genótipo A1/A1 e 27,3% (6/22) o genótipo polimórfico (A1/A2 ou A2/A2). Das que relataram ter cor de pele negra (n=5), 60,0% (3/5) eram do genótipo A1/A1 e 40,0% (2/5) tinham genótipo A1/A2 ou A2/A2, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos genótipos do polimorfismo PROGINS e a cor da pele no grupo das pacientes com endometriose inférteis ($P = 0,4712$ e $OR=1,7778$ (0,2358 a 13,4058)).

Dentre as pacientes férteis com endometriose que relataram ter a cor da pele branca (n=22), 68,2% (15/22) tem o genótipo A1/A1 e 31,8% (7/22) o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Das pacientes que relataram cor de pele negra (n=2), 50,0% (1/2) apresentavam genótipo A1/A1 e 50,0% (1/2) o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Não há diferença estatística significativa entre a cor da pele e as frequências dos genótipos para o polimorfismo PROGINS no grupo das pacientes com endometriose férteis ($P = 0,5652$ e $OR = 2,1429$ (0,1163 a 39,4714)).

No grupo controle, 77,8% (21/27) das pacientes que relataram ter cor de pele branca (n=27) apresentaram o genótipo A1/A1 e 22,2% (6/27) o genótipo

A1/A2 ou A2/A2. Entre as que relataram cor de pele negra (n=5), 80,0% (4/5) tinham o genótipo A1/A1 e 20,0% (1/5) o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Não houve diferença significativa em relação à cor da pele e o genótipo do polimorfismo PROGINS no grupo controle ($P = 0,7036$ e $OR = 0,8750$ (0,0817 a 9,3766)).

Tabela XVII - Comparação da variável cor da pele com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Grupos/ Variáveis	Cor da pele*							
	Branca		Negra		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
Endo + inf								
A1/A1	16	72,7	3	60,0				
A1/A2 + A2/A2	6	27,3	2	40,0	0,4712	1,7778	0,2358	13,4058
Total	22	100,0	5	100,0				
Endo + fert								
A1/A1	15	68,2	1	50,0				
A1/A2 + A2/A2	7	31,8	1	50,0	0,5652	2,1429	0,1163	39,4714
Total	22	100,0	2	100,0				
Controle								
A1/A1	21	77,8	4	80,0				
A1/A2 + A2/A2	6	22,2	1	20,0	0,7036	0,8750	0,0817	9,3766
Total	27	100,0	5	100,0				

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

* Informada pela paciente

Na tabela XVIII foi feita a comparação da variável atividade física com os genótipos do polimorfismo PROGINS nas pacientes com endometriose férteis, endometriose inférteis e grupo controle. Duas pacientes com endometriose não responderam ao questionário socioeconômico, impossibilitando sua classificação quanto a fertilidade e os hábitos sociais.

No grupo das pacientes inférteis com endometriose que praticam exercícios (n=15), 86,7% (13/15) apresentaram o genótipo A1/A1 e 13,3% (2/15) apresentaram o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Nas pacientes que não praticavam exercícios (n=12), 50,0% (6/12) tinham o genótipo A1/A1 e 50,0% (6/12) o genótipo A1/A2 ou A2/A2. A frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2 e A2/A2) é aproximadamente 4 vezes maior nas pacientes que não

praticam atividades físicas do que nas que praticam. A diferença entre o genótipo do polimorfismo PROGINS e a prática de atividade física no grupo das pacientes com endometriose inférteis é estatisticamente significativa ($P = 0,0493$ e $OR = 6,5000$ (1,0018 a 42,1733)).

Em relação às pacientes com endometriose férteis que praticavam de exercícios físicos ($n=17$), 64,7% (11/17) apresentaram genótipo A1/A1 e 35,3% (6/17) o genótipo polimórfico (A1/A2 ou A2/A2). Das que não praticavam atividade física ($n=8$), 75,0% (6/8) eram do genótipo A1/A1 e 25,0% (2/6) eram A1/A2 ou A2/A2. A diferença entre a prática ou não de atividade física do grupo endometriose fértil em relação ao genótipo do polimorfismo PROGINS, não é estatisticamente significativa ($P = 0,4867$ e $OR = 0,6111$ (0,0928 a 4,0222)).

Tabela XVIII - Comparação da variável atividade física com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Grupos/ Variáveis	Atividade física							
	Sim		Não		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
Endo + inf								
A1/A1	13	86,7	6	50,0				
A1/A2 + A2/A2	2	13,3	6	50,0	0,0493	6,5000	1,0018	42,1733
Total	15	100,0	12	100,0				
Endo + fert								
A1/A1	11	64,7	6	75,0				
A1/A2 + A2/A2	6	35,3	2	25,0	0,4867	0,6111	0,0928	4,0222
Total	17	100,0	8	100,0				
Controle								
A1/A1	23	79,3	15	93,8				
A1/A2 + A2/A2	6	20,7	1	6,2	0,2019	0,2556	0,0279	2,3406
Total	29	100,0	16	100,0				

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

Dentre as pacientes do grupo controle que praticavam exercícios físicos ($n=29$), 79,3% (23/29) apresentavam o genótipo A1/A1 e 20,7% (6/29) o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Entre as que não tinham como hábito a prática de atividade física ($n=16$), 93,8% (15/16) tinham o genótipo A1/A1 e 6,2% (1/16)

eram A1/A2 ou A2/A2. Não encontramos diferença significativa entre o hábito de praticar atividade física e o genótipo para o polimorfismo PROGINS no grupo controle ($P = 0,2019$ e $OR = 0,2556$ (0,0279 a 2,3406)).

Na tabela XIX temos a comparação da variável hábito de fumar com os genótipos do gene PROGINS A1/A1 e A1/A2 ou A2/A2 nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Em relação às pacientes com endometriose inférteis que fumam ($n=2$), 50,0% (1/2) apresentam o genótipo A1/A1 e 50,0% (1/2) apresentam polimorfismo do gene PROGINS (A1/A2 ou A2/A2). Entre as pacientes com endometriose inférteis que não relataram o hábito de fumar ($n=25$), 72,0% (18/25) apresentavam o genótipo A1/A1 e 28,0% (7/25) apresentam A1/A2 ou A2/A2. Não observamos diferença significativa entre as frequências genótípicas do polimorfismo PROGINS no grupo de pacientes com endometriose inférteis e o hábito de fumar ($P = 0,5128$ e $OR = 0,3889$ (0,0213 a 7,1110)).

Tabela XIX - Comparação da variável hábito de fumar com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Grupos/ Variáveis	Fumo							
	Sim		Não		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
Endo + inf								
A1/A1	1	50,0	18	72,0				
A1/A2 + A2/A2	1	50,0	7	28,0	0,5128	0,3889	0,0213	7,1110
Total	2	100,0	25	100,0				
Endo + fert								
A1/A1	1	100,0	16	66,7				
A1/A2 + A2/A2	0	0,0	8	33,3	0,6800	-	-	-
Total	1	100,0	24	100,0				
Controle								
A1/A1	3	100,0	35	83,3				
A1/A2 + A2/A2	0	0,0	7	16,7	0,5945	-	-	-
Total	3	100,0	42	100,0				

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

Em relação ao fumo, 100,0% (1/1) das pacientes com endometriose

férteis (n=1) que tem este hábito apresentam o genótipo A1/A1 e 0,0% (0/1) apresenta o polimorfismo do PROGINS (A1/A2 ou A2/A2). Dentre as pacientes que não tem este hábito social (n=24), 66,7% (16/24) eram A1/A1 e 33,3% (8/24) eram A1/A2 ou A2/A2. Não houve diferença significativa entre o hábito de fumar e as frequências do polimorfismo PROGINS ($P = 0,6800$).

Dentre as pacientes do grupo controle que tinham o hábito de fumar (n=3), 100,0% (3/3) apresentaram o genótipo A1/A1 e 0,0% (0/3) os genótipos A1/A2 ou A2/A2. Das pacientes que não tinham esse hábito (n=42), 83,3% (35/42) eram A1/A1 e 16,7% (7/42) com o genótipo A1/A2 ou A2/A2. Não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos do polimorfismo PROGINS de mulheres tabagistas e não tabagistas, sendo $P = 0,5945$.

Na tabela XX temos a comparação da variável hábito de ingerir bebida alcoólica com os genótipos A1/A1 e A1/A2 ou A2/A2 nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Em relação ao hábito de ingerir bebida alcoólica, 100,0% (2/2) das pacientes com endometriose inférteis (n=2) com este hábito apresentam o genótipo A1/A1 e 0,0% (0/2) apresentaram polimorfismo PROGINS A1/A2 ou A2/A2. Entre as pacientes com endometriose inférteis que não consomem bebida alcoólica (n=25), 68,0% (17/25) apresentam o genótipo A1/A1 e 32,0% (8/25) apresentam os genótipos A1/A2 ou A2/A2. Embora não tenhamos encontrado os genótipos polimórficos para PROGINS nas pacientes inférteis com endometriose que bebem, a diferença entre as frequências genotípicas das pacientes com endometriose inférteis em relação ao hábito de beber, não foi estatisticamente significativa ($P = 0,4872$).

Dentre as pacientes do grupo endometriose férteis que consomem bebidas alcoólicas (n=3), 100,0% (3/3) apresentam genótipo A1/A1 e 0,0% (0/3) apresentam os genótipos polimórficos (A1/A2 ou A2/A2). Das pacientes com endometriose férteis que não tem esse hábito social (n=22), 63,6% (14/22) eram do genótipo A1/A1 e 36,4% (8/22) eram do genótipo A1/A2 ou A2/A2. Não observamos diferença estatisticamente significativa entre o hábito de ingerir bebidas alcoólicas e o polimorfismo PROGINS ($P = 0,2957$).

Dentre as pacientes do grupo controle que ingerem bebidas alcoólicas (n=12), 91,7% (11/12) são do genótipo A1/A1 e 8,3% (1/12) são dos genótipos

A1/A2 ou A2/A2. Dentre as que não têm esse hábito (n=33), 81,8% (27/33) são do genótipo A1/A1 e 18,2% (6/33) são dos genótipos A1/A2 ou A2/A2. A diferença entre as frequências dos genótipos A1/A2 ou A2/A2 e o hábito de beber não é estatisticamente significativa ($P = 0,3870$ e $OR = 2,444$ (0,2628 a 22,7355)).

Tabela XX - Comparação da variável hábito de ingerir bebida alcoólica com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Grupos/ Variáveis	Álcool							
	Sim		Não		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
Endo + inf								
A1/A1	2	100,0	17	68,0				
A1/A2 + A2/A2	0	0,0	8	32,0	0,4872	-	-	-
Total	2	100,0	25	100,0				
Endo + fert								
A1/A1	3	100,0	14	63,6				
A1/A2 + A2/A2	0	0,0	8	36,4	0,2957	-	-	-
Total	3	100,0	22	100,0				
Controle								
A1/A1	11	91,7	27	81,8				
A1/A2 + A2/A2	1	8,3	6	18,2	0,3870	2,444	0,2628	22,7355
Total	12	100,0	33	100,0				

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

Na tabela XXI temos a comparação da variável uso de anticoncepcional com os genótipos A1/A1 e A1/A2 ou A2/A2 nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Nenhuma paciente do grupo endometriose infértil fazia uso de contraceptivo. Observamos a seguinte distribuição genotípica para polimorfismo PROGINS nas pacientes que não faziam uso de contraceptivos (n=27), 70,4% (19/27) apresentavam genótipo A1/A1 e 29,6% (8/27) genótipo A1/A2 ou A2/A2. E a diferença entre as frequências dos genótipos polimórficos para PROGINS entre as pacientes inférteis com endometriose que fazem uso ou não de anticoncepcionais, não foi estatisticamente significativa ($P = 1,000$).

Das pacientes do grupo endometriose férteis que faziam uso de

contraceptivos (n=15), 73,3% (11/15) apresentavam genótipo A1/A1 e 26,7% (4/15) apresentavam genótipos A1/A2 ou A2/A2. Dentre as que não faziam uso de contraceptivos (n=10), 60,0% (6/10) eram A1/A1 e 40,0% (4/10) eram A1/A2 ou A2/A2. Ao compararmos as frequências do polimorfismo PROGINS e o uso de contraceptivos em pacientes do grupo endometriose infértil, não observamos diferença estatisticamente significativa ($P = 0,3931$ e $OR = 1,8333$ (0,3329 a 10,0956)).

Entre as mulheres do grupo controle que fazem uso de contraceptivos (n=16), 68,8% (11/16) apresentam o genótipo A1/A1 e 31,2% (5/16) apresentam os genótipos A1/A2 ou A2/A2. Das que não usam anticoncepcionais (n=29), 93,1% (27/29) são do genótipo A1/A1 e 6,9% (2/29) são dos genótipos A1/A2 ou A2/A2. A frequência do genótipo A1/A2 ou A2/A2 nas mulheres que usam anticoncepcionais é aproximadamente quatro vezes maior do que nas pacientes que não fazem uso de contraceptivos, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0444$ e $OR = 0,1630$ (0,0274 a 0,9697)).

Tabela XXI - Comparação da variável uso de anticoncepcional com os genótipos do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle.

Grupos/ Variáveis	Anticoncepcional							
	Sim		Não		P^a	OR	Min	Max
	n	%	n	%				
Endo + inf								
A1/A1	0	0,0	19	70,4				
A1/A2 + A2/A2	0	0,0	8	29,6	1,000	-	-	-
Total	0	0,0	27	100,0				
Endo + fert								
A1/A1	11	73,3	6	60,0				
A1/A2 + A2/A2	4	26,7	4	40,0	0,3931	1,8333	0,3329	10,0956
Total	15	100,0	10	100,0				
Controle								
A1/A1	11	68,8	27	93,1				
A1/A2 + A2/A2	5	31,2	2	6,9	0,0444	0,1630	0,0274	0,9697
Total	16	100,0	29	100,0				

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

Na tabela XXII foi feita a correlação entre os genótipos do polimorfismo PROGINS e o polimorfismo no codon 72 do gene *p53* entre os grupos endometriose e controle. Dentre as pacientes do grupo endometriose com genótipo Arg/Arg para *p53* (n=20), 65,0% (13/20) apresentaram o genótipo A1/A1 para PROGINS e 35,0% (7/20) apresentam os genótipos polimórficos A1/A2 ou A2/A2 do PROGINS. No grupo controle, das pacientes que apresentaram o genótipo Arg/Arg (n=23) para *p53*, 82,6% (19/23) eram A1/A1 para o gene PROGINS e 17,4% (4/23) eram polimórficos (A1/A2 ou A2/A2). Embora a frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2 ou A2/A2) seja duas vezes maior no grupo endometriose do que no grupo controle entre as pacientes que apresentaram genótipo Arg/Arg para o gene *p53*, essa diferença não é estatisticamente significativa ($P = 0,1663$).

Dentre as pacientes do grupo endometriose com genótipos Arg/Pro ou Pro/Pro para o gene *p53* (n=33), 69,7% (23/33) eram do genótipo A1/A1 para PROGINS e 30,3% (10/33) eram polimórficos para PROGINS (A1/A2+A2/A2). Dos pacientes do grupo controle com genótipo Arg/Pro ou Pro/Pro para *p53* (n=17), 76,5% (13/17) eram A1/A1 para PROGINS e 23,5% (4/17) eram polimórficos (A1/A2 ou A2/A2) para o gene PROGINS. Não há diferença significativa entre as frequências nos grupos endometriose e controle que apresentam os genótipos Arg/Pro ou Pro/Pro para *p53* e os genótipos PROGINS ($P = 0,4379$).

Tabela XXII - Distribuição dos polimorfismos PROGINS e *p53* nos grupos endometriose e controle.

Genótipo <i>p53</i>	A1/A1		A1/A2+A2A2		Total		P^a
	n	%	n	%	n	%	
Arg/Arg							
Endometriose	13	65,0	7	35,0	20	100,0	0,1663
Controle	19	82,6	4	17,4	23	100,0	
Arg/Pro+Pro/Pro							
Endometriose	23	69,7	10	30,3	33	100,0	0,4379
Controle	13	76,5	4	23,5	17	100,0	

^a Valor P do Teste Exato de Fisher.

6. DISCUSSÃO

A endometriose é uma patologia que atinge de 10% a 15% das mulheres em idade reprodutiva. Devido ao aumento de sua incidência e as incertezas quanto ao seu diagnóstico e tratamento, a procura por marcadores moleculares e bioquímicos específicos tem se intensificado, o que ajudaria no diagnóstico e prevenção desta doença. Atualmente sua confirmação é feita através de um procedimento altamente invasivo, a laparoscopia (Abrão et al., 2007).

Por ser uma doença estrógeno dependente, uma resposta adequada da progesterona no endométrio é requerida para antagonizar a proliferação do tecido endometrial. Estruturalmente e funcionalmente os receptores de progesterona são essenciais para mediar os efeitos antiproliferativos da progesterona sobre o crescimento do tecido endometrial (Van Kaam et al., 2006).

Alterações genéticas no receptor de progesterona parecem estar envolvidas no desenvolvimento de patologias em tecidos estrógenos dependentes, assim como a endometriose. Entre essas alterações destaca-se a inserção de 306 pb no intron G entre os exons 7 e 8 do gene receptor de progesterona (Donaldson, 2002).

Wieser et al. (2002), descreveu pela primeira vez a associação entre uma variante genética do gene receptor de progesterona em mulheres com endometriose, sendo a inserção de *Alu* (com 306 pb) o polimorfismo descrito neste trabalho. Estudos anteriores mostravam a associação deste polimorfismo com o câncer de ovário (Rowe et al., 1995), assim como a presença do alelo polimórfico (A2) causando um efeito protetor contra o câncer de mama em mulheres pré-menopausadas (Wang-Gohrke et al. 2000).

O grupo endometriose de estudo é composto por mulheres mais novas (com idade média de 32,5 anos) que procuraram o médico queixando-se de dor e/ou infertilidade, sendo então diagnosticadas com endometriose. As mulheres do grupo controle apresentam idade média mais elevada (>37 anos), corroborando com o não desenvolvimento da endometriose nesse grupo durante a idade reprodutiva (<35 anos), período no qual a mulher está mais susceptível ao desenvolvimento desta patologia.

Nossa pesquisa demonstrou uma correlação significativa entre a inserção de *Alu* (306 pb) no gene receptor de progesterona e a endometriose, onde observamos que 33,3% das pacientes com endometriose apresentaram polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2) e apenas 15,5% das pacientes do grupo controle apresentaram esse mesmo polimorfismo. A frequência do polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2) no grupo endometriose é 2,1 vezes maior do que no grupo controle.

Os resultados vão de encontro com os únicos três estudos publicados. Um deles, realizado no Brasil (Universidade Federal de São Paulo) por Carvalho et al. (2004), composto por 66 pacientes com endometriose, dos quais 26 apresentavam grau I/II de endometriose e 40 apresentavam grau III/IV e o grupo controle composto por 38 mulheres na pós-menopausa. Nesse trabalho 67,0% das pacientes com endometriose apresentaram o genótipo selvagem (A1/A1) e 33,0% os genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2). No grupo controle o genótipo selvagem (A1/A1) estava presente em 79,0% das mulheres e os genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) em 21,0% das mulheres. A frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) no grupo endometriose foi 1,5 vezes maior do que no grupo controle.

Essa significância também foi observada em uma pesquisa austríaca realizada por Wieser et al. (2002) na Universidade de Viena, onde os grupos controle e endometriose foram compostos por 107 e 95 mulheres brancas (caucasóides), respectivamente. No grupo endometriose o genótipo selvagem (A1/A1) foi observado em 68,4% das pacientes, enquanto 31,6% apresentaram o polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2). No grupo controle, 85,0% das mulheres apresentaram o genótipo A1/A1 e 15,0% apresentaram polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2). A frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2+A2/A2) duas vezes maior no grupo endometriose o que no grupo controle.

Lattuada et al. (2004) realizou um estudo na Universidade de Milão com 258 mulheres caucasianas de origem italiana, onde 131 apresentaram endometriose e 127 compunham o grupo controle. Nesse estudo observou-se que 67,9% das pacientes com endometriose apresentaram o genótipo selvagem (A1/A1) e 32,1% apresentaram polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2). No grupo controle foi observado que 78,7% das mulheres apresentaram o genótipo selvagem (A1/A1) e 21,3% apresentaram

polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2). A frequência do polimorfismo PROGINS foi significativamente maior nas pacientes com endometriose do que no grupo controle, corroborando assim com os resultados encontrados em nosso trabalho.

Entretanto os estudos de Treloar et al. (2005) e Van Kaam et al. (2006), realizados na Austrália e na Holanda, respectivamente, não encontraram em suas conclusões uma correlação entre o polimorfismo PROGINS e a endometriose. Provavelmente, os resultados obtidos nos trabalhos australianos e holandeses foram diferentes do nosso devido a focos distintos de pesquisa. Em nosso trabalho foi analisada a presença ou ausência da inserção de *Alu* no intron G do gene receptor de progesterona e o estudo realizado por Van Kaam et al. (2006) analisaram outros tipos de polimorfismo, a mutação Val660Leu no éxon 4, enquanto Treloar et al. (2005) analisaram oito tipos diferentes de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene receptor de progesterona e não utilizou um grupo controle para comparar com seu grupo de estudo.

Não foi encontrada em nosso estudo uma associação significativa entre o polimorfismo PROGINS e a progressão da endometriose, pois as frequências deste polimorfismo nos diferentes grupos apresentaram-se semelhantes. As pacientes do grupo endometriose grau I/II apresentaram 31,8% de polimorfismo PROGINS (A1/A2+A2/A2) e, no grupo endometriose grau III/IV, 31,0%.

Entretanto a correlação foi verificada no estudo de Carvalho et al. (2004) entre a progressão da endometriose e a presença do polimorfismo PROGINS, onde o polimorfismo foi encontrado em 27,0% das pacientes com endometriose grau I/II e em 38,0% das pacientes com endometriose grau III/IV. Ao refazermos a estatística de Carvalho et al. (2004) utilizando números absolutos, não encontramos diferença significativa entre os grupos endometriose grau I/II e grau III/IV, corroborando com os resultados encontrados em nosso trabalho.

No nosso estudo também não encontramos associação entre a cor da pele e os diferentes genótipos do polimorfismo do gene receptor de progesterona nos grupos endometriose infértil, endometriose fértil e controle. Também, Gomes et al. (2006) que analisou os genótipos do polimorfismo PROGINS em relação a raça apenas em seu grupo controle, não encontrou

uma associação significativa entre os genótipos do polimorfismo PROGINS e a cor da pele, corroborando com nosso estudo.

Outros estudos mostraram que mulheres africano-americanas têm taxas de incidência de endometriose menores que americanas caucasianas, enquanto as americanas asiáticas parecem ter taxas mais elevadas do que as mulheres caucasianas, porém ainda faltam dados comparativos para as mulheres hispânicas (Flores et al., 2008; Missmer et al., 2004).

Já Miyazawa (1976) em sua pesquisa realizada em dois hospitais no Havaí e em um no Japão notou uma maior incidência de endometriose em mulheres orientais comparando com não-orientais. Porém esses estudos não abordavam o polimorfismo PROGINS, o polimorfismo analisado em nosso estudo (Miyazawa, 1976).

Outro hábito social analisado foi a atividade física, e no estudo de Dhillon e Holt em 2003 demonstrou que mulheres com alta frequência de atividade física durante os dois anos que antecederam o estudo tiveram uma redução do risco de endometrioma de 76% quando comparadas a mulheres que não tinham essa alta frequência de atividade física. Essa redução do risco de endometriose ocorre porque em algumas mulheres a rotina da atividade física suprime a liberação no hipotálamo do hormônio liberador de gonadotrofinas, que limita a secreção hipofisária do LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), que por sua vez reduz a atividade ovariana e os níveis de estrógeno (Dhillon e Holt, 2003). Em nosso estudo não observamos essa correlação entre a prática da atividade e a redução do risco da endometriose.

O tabagismo é conhecido por ter efeito sobre o meio hormonal causando uma diminuição dos níveis de estrógeno, uma vez que a nicotina e a cotinina interferem na síntese de esteróides servindo como um agente protetor da endometriose. Embora os fumantes sejam estrógenos deficientes, eles também são expostos a altos níveis de dioxinas e outros componentes da fumaça do cigarro que têm atividade hormônio like, provocando assim resultados conflitantes sobre o tabagismo e a endometriose (Missmer et al., 2004). Não existem relatos sobre uma possível associação entre o hábito de fumar e o polimorfismo PROGINS. Não verificamos em nosso estudo uma correlação entre a endometriose, o polimorfismo PROGINS e o tabagismo.

O consumo moderado de álcool aumenta os níveis de estrógeno, colaborando para o desenvolvimento da endometriose. Relatos também têm correlacionado o consumo de bebidas alcoólicas com o aumento da infertilidade de causa anovulatória e devido à endometriose (Ribeiro Júnior, 2009; Missmer et al., 2004). Esses relatos não correlacionam o consumo de álcool e o polimorfismo PROGINS, porém como o etilismo é um fator desencadeante da endometriose assim como o polimorfismo PROGINS comparamos essas duas variáveis procurando identificar uma possível correlação. Em nosso estudo, o número de pacientes com endometriose que faz uso de bebidas alcoólicas é pequeno (n=5), limitando o poder dos nossos testes estatísticos para verificar a correlação entre a presença do polimorfismo PROGINS nos grupos endometriose fértil, endometriose infértil e controle e o consumo de álcool. Seria interessante verificar este parâmetro em um número maior de pacientes.

O uso cíclico de contraceptivos orais geralmente resulta em um endométrio fino, com conseqüente sangramento mínimo. Pesquisadores têm relatado que o uso de anticoncepcionais por períodos prolongados podem inibir a progressão da endometriose ou até mesmo preveni-la, devido o seu efeito bloqueador da produção de estrógeno (Ribeiro Júnior, 2009; Kirshon e Poindexter, 1988). No grupo controle da nossa pesquisa observamos uma maior frequência dos genótipos polimórficos para PROGINS nas pacientes que fazem uso de anticoncepcional, sugerindo que o não desenvolvimento desta patologia seria devido ao uso do contraceptivo que estaria atuando como fator de proteção para o desenvolvimento da endometriose.

Nosso estudo analisou a possibilidade de associação entre o 2 polimorfismos o do códon 72 do gene *p53* e o PROGINS e a endometriose, pois alguns estudos correlacionaram a endometriose e esses polimorfismos separadamente, mas nada relacionado a ambos. Porém não foi observada em nosso estudo a correlação significativa entre a presença da arginina em homozigose (ARG/ARG) atuando como fator de proteção para o desenvolvimento da endometriose em pacientes que apresentaram polimorfismo PROGINS, assim como a presença de pelo menos um alelo prolina associado com o polimorfismo PROGINS, não aumentou a suscetibilidade à endometriose, em comparação a uma paciente ARG/ARG.

Alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre o polimorfismo do códon 72 do gene *p53* e a endometriose. Pacientes que apresentam o alelo arginina em homozigose (ARG/ARG) apresentam uma baixa suscetibilidade de desenvolver endometriose. A arginina atua como fator de proteção para endometriose e a presença do alelo prolina, seja em homozigose (PRO / PRO) ou heterozigose (PRO/ARG), estaria relacionada com uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da patologia (Ribeiro Júnior, 2009; Lattuada et al., 2004). Outros estudos não encontraram diferença significativa entre o polimorfismo *p53* no códon 72 e a endometriose, sugerindo um papel secundário deste polimorfismo em relação à endometriose (Ammendola et al., 2007).

A herança poligênica parece estar ligada ao desenvolvimento da endometriose, dentre eles destacamos o polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS). Essa busca por marcadores moleculares específicos poderão contribuir para a prevenção e o diagnóstico precoce desta patologia.

7. CONCLUSÃO

- Nossos resultados indicaram uma diferença significativa entre o polimorfismo PROGINS e a patologia endometriose.
- A frequência dos genótipos polimórficos A1/A2 e A2/A2 é aproximadamente 2,1 vezes maior no grupo endometriose do que no grupo controle.
- A frequência dos genótipos A1/A2 e A2/A2 no grupo endometriose inférteis é 3,7 vezes maior nas pacientes que não praticavam exercícios físicos do que nas que praticavam alguma atividade física.
- A frequência dos genótipos A1/A2 e A2/A2 é 4,5 vezes maior nas pacientes do grupo controle que usam contraceptivos do que nas pacientes desse grupo que não fazem uso do mesmo.
- A presença da arginina no codon 72 do gene *p53* não serviu como fator de proteção para endometriose nas pacientes que apresentavam polimorfismo PROGINS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrão MS. Endometriose uma visão contemporânea. Rio de Janeiro: Ed. Revinter; 2000. 1p.
2. Abrão MS, Bassi MA, Podgaec S, Júnior JAD, Sobrado CW, Filho NA. Endometriose intestinal: uma doença benigna? Rev Assoc Med Bras 2009; 55(5): 611-6.
3. Abrão MS, Podgaec S, Dias Jr JA. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. Prat Hosp. 2007; 50:73-77.
4. Amaral VF, Ferriani RA, Sá MFS, Nogueira AA, Silva JCR, Silva ACJSR, Moura MD. Positive correlation between serum and peritoneal fluid CA-125 levels in women with pelvic endometriosis. Sao Paulo Med J. 2006; 124(4):223-7.
5. Ammendola M, Gloria-Bottini F, Sesti F, Piccione E, Bottini E. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. Fertil Steril. 2008 Aug; 90(2):406-8.
6. Arvanitis DA, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Komantakis EE, Spandidos DA. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. Fertil Steril. 2001; 76:1202-6.
7. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA; 2007.
8. Bahtiyar MO, Seli E, Oral E, Senturk LM, Zreik TG, Arici A. Follicular fluid of women with endometriosis stimulates the proliferation of endometrial stromal cells. Hum. Reprod. 1998; 13(12):3492-5.

9. 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 Endometriosis in a French population. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 9(3):775-80.
10. Bedone AJ, Monteiro IMU, Canfour CC, Ribeiro Filho AD. Correlação entre manifestações clínicas e achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica. *Reprodução.* 1994 Out–Dez; 9(4):219-21.
11. Berbel BT, Podgaec S, Abrão MS. Análise da associação entre o quadro clínico referido pelas pacientes portadoras de endometriose e o local de acometimento da doença. *São Paulo: Rev Med.* 2008 Jul-Set; 87(3):195-200.
12. Borlot AMM, Trindade ZA. As tecnologias de reprodução assistida e as representações sociais de filho biológico. *Estud. Psicol.* 2004; 9(1):663-73.
13. Carvalho BR, Silva JCR, Silva ACJSR, Barbosa HF, Poli Neto OB, Reis FJC, Nogueira AA. Endometriose umbilical sem cirurgia pélvica prévia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008; 30(4):167-70.
14. 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):613-17.
15. Carvalhosa AA. Pesquisa dos receptores de estrógeno (RE) e do receptor de progesterona (RP) in vivo e verificação da influência destes hormônios in vitro em duas linhagens de adenomas pleomórficos [Tese]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2001.
16. Castelli LCV. Hibridação genômica comparativa em endometriose [Tese de Doutorado em Genética]. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2008.

17. Chaco K, Andersen P, Scommegna A. The effect of peritoneal macrophage incubates on the spermatozoa assay. *Fertil Steril*. 1987; 48:694.
18. Chatzikokkinou P, Thorfinn J, Angelidis IK, Papa G, Trevisan G. Spontaneous endometriosis in an umbilical skin lesion. *Acta Dermatoven APA*. 2009; 18(3):126-30.
19. Cericato L. Resposta cortisolêmica e sensibilidade ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) de Jundiá (*Rhamdia quelen*) em exposição sub-letal a agrotóxicos [Tese de Doutorado em Aquicultura]. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP; 2009.
20. Colombo J, Raphal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *RBC*. 2009; 55(2):165-74.
21. Coulam CB, Jeyendran RS, Roussev R. Association of progesterone receptor polymorphisms with recurrent implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25:119–22.
22. 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; 63:5236-8.
23. De Vivo I, Huggins GS, Hankinson SE, Lescault PJ, Boezen M, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *PNAS*. 2002; 99(19):12263–8.
24. Dentillo DB. Expressão gênica diferencial em tecido endometrial tóxico e lesões endometrióticas [Tese]. Ribeirão Preto, Universidade de São

- Paulo, Faculdade de Medicina; 2007.
25. Dhillon PK, Holt VL. Recreational Physical Activity and Endometrioma Risk. *Am J Epidemiol.* 2003; 158:156–64
 26. Donaldson CJ, Crapanzano JP, Watson JC, Levine EA, Batzer MA. PROGINS Alu insertion and human genomic diversity. *Mutat. Res.* 2002; 501:137-41.
 27. Ejzenberg D. Avaliação das concentrações das interleucinas 1- e 6 e da proteína amilóide A, no líquido peritoneal e no soro de pacientes com endometriose pélvica [Dissertação de Mestrado em Ciências]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; 2007.
 28. Fabjani G, Tong D, Czerwenka K, Schuster E, Speiser P, Leodolter S, Zeillinger R. Humann Progesterone receptor gene polymorphism PROGINS and risk for breast cancer in Austrian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 72(2):131-37.
 29. Fakh H, Bagget B, Holtz G, Interleukin I. A possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril.* 1987; 47:213.
 30. Fedelle L, Anchi S, Boccioloni L. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 1992; 79:767-9.
 31. Fernandes AF. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. Vila Real-Portugal: Ver. Port. Zootec. 2005; 1:67-86.
 32. Fernandes K, Barros SMO. Avaliação do Perfil Reprodutivo dos Casais Assistidos no Setor de Reprodução Humana da Universidade Federal de São Paulo. *Acta Paul Enf.* 2000; 13, Número especial, Parte II.
 33. Fletcher RH, Fletcher WS. *Epidemiologia Clínica. Elementos Essenciais.*

Artmed 4ª Edição, 2006.

34. Flores I, Abreu S, Abac S, Fourquet J, Laboy J, Ríos-Bedoya C. Self-reported prevalence of endometriosis and its symptoms among Puerto Rican women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008;100(3):257–61.
35. Giacomazzi, J. Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismo nos genes ER, PR e STK15 em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre [Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas]. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
36. Giordano MG. *Ginecologia Endócrina e da Reprodução.* São Paulo: Fundo Ed. Byk; 1998. 225p.
37. Glitz CL. Concentração sérica e peritoneal de interleucina-18 em mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve [Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas]. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
38. Glitz C, Souza CA, Rodini GP, Genro V, Bilibio JP, Senger M, Cunha-Filho JS. Peritoneal and serum interleukin-18 levels are not increased in women with minimum or mild endometriosis. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42:1039-43.
39. Gomes MTV, Castro RA, Villanova FE, Silva IDCG, Baracat EC, Lima GR, Girão MJBC. Relação entre polimorfismo do gene do receptor de progesterona, raça, paridade e ocorrência de leiomioma uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(9):278-84.
40. Guembarovski RL. Análise de associação dos genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 e da perda de heterozigose em 3p em portadores de carcinomas bucais [Tese de Doutorado em Genética]. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,

Departamento de Genética; 2007.

41. Guembarovski RL, Cólus IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1): distribuição étnica e relação com o câncer. Londrina: Semina: Ci Biol. Saúde. 2001 Jan-Dez; 22:3-9.
42. Guo SW. Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies. Mol. Hum. Reprod. 2005; 11(10):729–43.
43. Hadfield RM, Manek S, Weeks DE, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH, OXEGENE Collaborative Group. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. Mol. Hum. Reprod. 2001; 7(11):1073-8.
44. Halme J, Becker S, Hammond M. Pelvic macrophages in normal and infertile women. Am J Obstet Gynecol. 1982; 142: 890.
45. Halme J, Hammond MG, Hulka JF. Incidence of retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis. Obstet Gynecol. 1984; 64:151.
46. Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. J. Reprod. Med. 1976; 16:135-8.
47. Hong YC, Lee KH, Yi CH, Ha EH, Christiani DC. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. Toxicol Lett. 2002; 129:255-62.
48. Hsieh YT, Lin CS. P53 codon 11,72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. Int J Biol Sci. 2006; 2.
49. Hurtado R. Análise inter e intra-observador no diagnóstico anátomo-

- patológico de endometriose [Dissertação de Mestrado em Medicina]. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
- 50.** Johnson MCP, Pinto CO, Alves ALC, Palomino AA, Fuentes AG, Boric MAS, Veja MB. P450 Arom y microambiente estrogénico en endometrios eutópicos de mujeres con endometriosis. Rev Méd Chile. 2004; 132:1475-82.
- 51.** Ribeiro Júnior CL. Análise do polimorfismo do gene p53 em pacientes com clínica de endometriose associado à infertilidade [Dissertação de Mestrado em Genética]. Goiânia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás; 2009.
- 52.** Kamergorodsky, G. Avaliação da classificação histológica da endometriose observada em implantes de mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda [Dissertação de Mestrado em Medicina]. São Paulo, Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2007.
- 53.** Kirshon B, Poindexter AN. Contraception: A risk factor for endometriosis. Obstetrics & Gynecology. 1988; 71(6): 829-31.
- 54.** Kirshon B, Poindexter AN, Fast J. Endometriosis in multiparous women. J Reprod Med. 1989 Mar;34(3):215-7.
- 55.** Kurz C, Tempfer CB, Boeckscoer S, Unfried G, Nagele F, Hefler LA. The PROGINS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage. J. Soc. Gynecol Investig. 2001; 8:295-8.
- 56.** Kvitko K, Rohr P, Zucchetti G, Silla LMR. Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias. RBB. 2008;6(4):369-73.
- 57.** Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M, Blasio AMD.

- Analysis of the codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients with endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10(9):651–4.
- 58.** Lattuada D, Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61:190–194.
- 59.** Lewin B. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall. 2004.
- 60.** Lima PL. *Genética humana*. Editora Harbra. 3ª Edição, 1996. p.31.
- 61.** Lima AP, Moura MD, Rosa e Silva AAM. Prolactin and cortisol levels in women with endometriosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006; 39:1121-7.
- 62.** Linhares JJ, Silva IDCG, Nogueira NC, Noronha EC, Ferraro O, Baracat FF. Polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controle. Rio de Janeiro: *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2005 Ago; 27(8):473-8.
- 63.** Lobato, VV. Influencia do ciclo menstrual nas alterações de limiar de dor à pressão (LDP) na musculatura mastigatória de mulheres com sinais e sintomas de disfunção temporomandibular [Dissertação]. Bauru, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.
- 64.** Lorençatto C, Vieira MJN, Pinto CLB, Petta CA. Avaliação da frequência de depressão em pacientes com endometriose e dor pélvica. *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(3): 217-21.
- 65.** Mafra FA, Rosset VF, Galvão F, Gimenes C, Christofolini D, Bianco B, Barbosa CP. Avaliação genético-clínica na determinação dos fatores de risco para endometriose correlacionados à infertilidade em mulheres portadoras de endometriose. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética; Salvador; 2008 Sep. 16-19; 177p.

- 66.**Manolitsas TP, Englefield P, Eccles DM, Campbell IG. No association of a 306-bp insertion polymorphism in the progesterone receptor gene with ovarian and breast cancer. *Br J Cancer*. 1997; 75(9):1397-9.
- 67.**Marques MR. Endometriose e infertilidade: revisão sistemática da literatura e relato de casos [TCC]. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
- 68.**Melegario SM, Simão R, Vale RGS, Batista LA, Novaes JS. A influência do ciclo menstrual na flexibilidade em praticantes de ginástica de academia. *Rev Bras Med Esporte*. 2006 Mai-Jun; 12(3):125-8.
- 69.**Meola J. Análise da expressão gênica diferencial em endometriose. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética; 2008.
- 70.**Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbier RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of Laparoscopically Confirmed Endometriosis by Demographic, Anthropometric, and Lifestyle Factors. *Am J Epidemiol* 2004;160:784–796.
- 71.**Miyazawa K. Incidence of endometriosis among japanese women. *Obstetrics & Gynecology*. 1976 Oct; 48(4):407-9.
- 72.**Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol*. 2004; 159:319–35.
- 73.**Moura MD, Pereira TN, Nogueira AA, Ferriani RA, Sala RMR. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. Rio de Janeiro: Clinical Treatmento Evaluation of Endometriosis. *Rev. Brasil. Ginecol. E Obstet*. 1999; 21(2):85-90.
- 74.**Nakata LC, Bertollo EMC, Dos Santos I, Oliani AH, VAZ DCM, Oliveira

- GH, Pavarino-Bertelli EC. Biomarcadores de Susceptibilidade à Endometriosis. RBGO. 2004; 26(4):299-304.
- 75.**Nunes FM. Estudos estruturais e biofísicos dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos e seus complexos com ligantes isoforma-específicos [Tese]. São Carlos, Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos; 2006.
- 76.**Olive DL, Pritts EA. Treatment of endometriosis. N Engl J Med. 2001 Jul; 345(4):266-75.
- 77.**Pasternak JJ. Uma introdução à Genética Molecular Humana. Guanabara – Koogan. 2º edição, 2007. p.110.
- 78.**Pearce CL, Hirschhorn JN, Wu AH, Burtt NP, Stram DO, Young S, Kolonel LN, Henderson BE, Altshuler D, Pike MC. Clarifying the PROGENS Allele Association in Ovarian and Breast Cancer Risk: A Haplotype-Based Analysis. J. Natl. Cancer Inst. 2005 Jan; 97(1):51-59.
- 79.**Podgaec S. Padrões de resposta imune em pacientes com endometriose [Tese de Doutorado em Medicina]. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
- 80.**Pooley KA, Healey CS, Smith PL, Pharoah PDP, Thompson D, Tee L, West J, Jordan C, Easton DF, Ponder BAJ, Dunning AM. Association of the Progesterone Receptor Gene with Breast Cancer Risk: A Single-Nucleotide Polymorphism Tagging Approach. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Apr; 15(4):675-82.
- 81.**Ranney B. Endometriosis: pathogenesis, symptoms and findings. Clin. Obstet. Gynecol. 1980; 23:65-874.
- 82.**Renner SP, Strick R, Oppelt P, Fasching PA, Engel S, Baumann R, Beckmann MW, Strissel PL. Evaluation of clinical parameters and

- estrogen receptor alpha gene polymorphisms for patients with endometriosis. *Reproduction*. 2006; 131:153–61.
- 83.** Riachi SHMS. Imunoexpressão da enzima aromatase p450 em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda [Dissertação de Mestrado em Medicina]. São Paulo, Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2008.
- 84.** Ribeiro AA, Ribeiro PAAG, Rodrigues FC, Donadio N, Auge APF, Aoki T. Valor do enema de bário com duplo contraste no diagnóstico da endometriose do reto e sigmóide. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008; 30(8):400-5.
- 85.** Rocha LC. Análise de polimorfismos do gene da fibrilina-1 em indivíduos portadores de hérnia inguinal através do sequenciamento de DNA [Tese de Doutorado em Ciências]. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.
- 86.** Rodrigues De Lima G, Baracat EC. *Ginecologia endócrina*. Atheneu. São Paulo, 1995.
- 87.** Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol*. 2007; 38:331–50.
- 88.** Rossit A, Froes NDTC. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Ver. Soc. Bras. Cancerol*. 2000; 3:26-30.
- 89.** Rowe SM, Coughlan SJ, Mckenna NJ, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res*. 1995; 55:2743-5.

- 90.** Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927; 14:422-69.
- 91.** Schmidt L, Burkiewicz CJC, Pastro PC, Silva MB, Skare TL. Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide e Endometriose. *Rev Bras Reumatol.* 2006 Nov-Dez; 46(6):432-4.
- 92.** Seniski GG. Análise do perfil de metilação do promotor do gene *adam33* e sua correlação clínica com câncer de mama (Dissertação). Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas; 2008.
- 93.** Singh MN, Stringfellow HF, Taylor SE, Ashton KM, Ahmad M, Abdo KR, El-Agnaf OMA, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Elevated expression of CYP1A1 and α -SYNUCLEIN in human ectopic (ovarian) endometriosis compared with eutopic endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 2008; 14(11):655–63.
- 94.** Silva JSA, Utiyama SRR. Principais Auto-Anticorpos Envolvidos na Infertilidade Masculina e Feminina, com Ênfase nos Aspectos Clínicos e Laboratoriais. *RBAC.* 2005; 37(4):233-8.
- 95.** Simonetti MPB. Da Cosmologia à Estereosseletividade na Anestesia Regional. *Novo Desafio à Indústria Farmacêutica.* São Paulo: Rev. Bras. Anesthesiol. 2000; 50(6):479-80.
- 96.** Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BCJM. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II—endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2009; 15(1):97-118.
- 97.** Thomas EJ. Endometriosis. *Br Med J.* 1993; 306:158-9.
- 98.** Thompson JS, Thompson MW. (1993). *Genética Médica.* Guanabara -

Koogan. 5ª Edição, 1993. p.85.

99. Treloar SA, Zhao ZZ, Armitage T, Duffy DL, Wicks J, O'Connor DT, Martin NG, Montgomery GW. Association between polymorphisms in the progesterone receptor gene and endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2005; 11(9):641–7.
100. Valadares JC, Ferreira LV, Filho HC, Silva MAR. Transtorno disfórico pré-menstrual, conceito, história, epidemiologia e etiologia. São Paulo: *Rev. Psiq. Clín.* 2006; 33(3):117-23.
101. Van Kaam KJAF, Romano A, Schouten JP, Dunselman GAJ, Groothuis PG. Progesterone receptor polymorphism +331G/A is associated with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.* 2006; 18:1-7
102. Velasco I, Rueda J, Acién P. Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12(6):377–81.
103. Vila ACD. A endometriose e sua relação coma infertilidade feminina e fatores ambientais [Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde]. Goiânia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás; 2007.
104. Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H, Kieback DG, Runnebaum IB. Progesterone Receptor Gene Polymorphism Is Associated with Decreased Risk for Breast Cancer by Age 50. *Cancer Res.* 2000; 60(9):2348-50.
105. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene. International Edition. Fifth Ediction, 2004.*
106. Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis – associated

infertility. J. Reprod. Med. 1989; 34:41-6.

- 107.** Wieser F, Scheneberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometrioses. Fertil Steril. 2002; 77:309-12.

- 108.** Yáñez RA, González MM. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación (primera parte). Ginecol Obstet Mex. 2007; 75(8):477-83.

- 109.** Yáñez RA, González MM. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación (segunda parte). Ginecol Obstet Mex. 2008; 76(9):549-57.

ANEXO I

QUESTIONÁRIO: Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em pacientes com 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

-Paridade:

gesta () para () aborto () cesariana () Idade dos filhos ()

RESULTADO ANATOMO-PATOLÓGICO:

ANEXO II

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

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 penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo telefone 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em pacientes com endometriose associado à infertilidade.

Coordenador Responsável: Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Telefones para contatos: 39467-1385 e 3946-1442

Eu abaixo qualificado, após ter sido esclarecido verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: **Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em pacientes com endometriose associado à infertilidade** realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Pontifícia 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, e resposta de um questionário, e que o mesmo será utilizados em exames correlacionados mantendo o objetivo de complementar o meu diagnóstico e de pesquisa. **Vamos coletar 15 ml de sangue venoso, e este material será utilizado para analisar diferentes genes associados à endometriose para identificarmos um candidato a diagnóstico precoce de endometriose associado ou não a infertilidade.**

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.

Igualmente, 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.

O risco que me submeto ao coletar sangue venoso periférico é de hematomas e que caso ocorra o mesmo será atendido pelo médico responsável pela coleta no mesmo Hospital.

Os benefícios desta pesquisa será a criação de marcadores moleculares para diagnóstico precoce com utilização de sangue periférico com vantagens as cirúrgicas hoje existentes.

Você poderá ser ressarcido de despesas caso a mesma ocorra e poderá ser indenizado se advir algum risco.

- Nome do pesquisador:

- Assinatura do paciente:

- Data: ____ / ____ / ____

ANEXO III

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,

RG: _____, CPF: _____,

nº de prontuário: _____, nº de matrícula: _____,

abaixo assinado, concordo em participar no projeto: **Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em pacientes com endometriose associado à infertilidade** como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido 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 a 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: _____

Observações complementares:

ANEXO IV

Sensibilidade e especificidade do primer do gene receptor de progesterona (PROGINS):

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=BioassayBlast&BLAST_PROGRAMS=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch

Score = 48.1 bits (24), Expect = 5e-04

Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query 22 AAAAGTATTTTCTTGCTAAATGTC 45

Sbjct 4474166 AAAAGTATTTTCTTGCTAAATGTC 4474189

ANEXO V

A sensibilidade de um teste é definida pela proporção de pessoas com a doença que têm um teste positivo, ou seja um teste sensível raramente deixará passar pessoas que tenham a doença. Enquanto a especificidade é a proporção de indivíduos sem a doença que têm um teste negativo. Um teste específico raramente classificará de forma errônea as pessoas como sendo portadoras da doença quando elas não são (Fletcher e Fletcher, 2006).

Denominamos como valor preditivo a probabilidade da doença, dados os resultados de um teste. O valor preditivo positivo é a probabilidade da doença em um paciente com um resultado positivo (anormal) do teste e o valor preditivo negativo é a probabilidade de não ter a doença quando o valor do teste for negativo (normal) (Fletcher e Fletcher, 2006).

A análise do polimorfismo PROGINS em associação com a endometriose apresentou sensibilidade de 33%, especificidade de 84%, valor preditivo positivo de 72% e valor preditivo negativo de 51%. Sendo um bom teste para descartar a presença desta patologia, pois a cada 100 mulheres que apresentarem o genótipo selvagem (A1/A1) 84 não apresentarão endometriose (Tabela XXIII).

Tabela XXIII - Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo do polimorfismo PROGINS em relação à endometriose.

		Endometriose				VP+	VP-
		Pres.	Aus.	S	E		
Polimorfismo (A2)	Pres.	18	7	33%	84%	72%	51%
	Aus.	36	38				

S: Sensibilidade; E: Especificidade; VP+: Valor Preditivo Positivo; VP-: Valor Preditivo Negativo