



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**MESTRADO EM GENÉTICA**

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GSTM1 E GSTT1 EM**  
**MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

**ARIANE BOCALETTO FRARE**

**ORIENTADORA: Profª Drª Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura**  
**CO – ORIENTADORA: MSc. Bárbara Marioto Bordin**

**Goiânia, GO**

**2011**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**MESTRADO EM GENÉTICA**

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GSTM1 E GSTT1 EM**  
**MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

**ARIANE BOCALETTO FRARE**

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

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura**

**CO – ORIENTADORA: MSc. Bárbara Marioto Bordin**

**Goiânia, GO**

**2011**

]]

F839i Frare, Ariane Bocaletto.

Investigação dos polimorfismos GSTMI e GSTTI em mulheres com endometriose [manuscrito] / Ariane Bocaletto Frare. – 2011.

87 f.

Bibliografia: f. 72-83

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura.

Inclui lista de Tabelas, Abreviaturas e Símbolos

1. Endometriose. 2. Polimorfismos. 3. GSTMI. 4. GSTTI. 5. Infertilidade feminina. I. Título.

CDU: 618.1(043)



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário  
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 16 DE JUNHO DE 2011 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA**

*10,0 (dez inteiros —)*

Dr.<sup>a</sup> Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura - PUC Goiás  
(presidente orientadora)

Dr.<sup>a</sup> Ângela Adamski da Silva Reis - UFG  
(membro)

Dr.<sup>a</sup> Rejane da Silva Sena Barcelos – PUC Goiás  
(membro)

Bárbara Mariotto Bordin, M.Sc – PUC Goiás  
(membro)

**Dedico,**

**Aos meus queridos pais, Aristeu e Edna, e ao meu irmão Leonardo,**

Qualquer palavra de gratidão seria pequena diante da generosidade desses corações!  
Dedico a vocês mais esta conquista, pela certeza de nunca terem me desamparado, mesmo estando longe fisicamente, sempre estiveram presentes em minha vida. Obrigada por me aceitarem como sou, por respeitarem a minha liberdade e minhas escolhas, por terem me dado asas com as quais posso voar e por serem o coloquentinho, o melhor aconchego que conheço. Não existem palavras no universo capazes de exprimir o que vocês representam em minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pelas infinitas orações.

**AMO MUITO VOCÊS!!!**

## *Agradecimentos*

À Deus primeiramente, por ter me dado força de vontade para nunca desistir apesar das dificuldades, por estar sempre ao meu lado, me protegendo e guiando.

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida, meu porto seguro, junto dos quais todas as dificuldades se tornam leves, muito obrigada pelo apoio e confiança em todos os momentos e em todas as escolhas. Ao meu irmão pelo carinho, paciência e por sempre estar pronto para me auxiliar, com atitudes e palavras. Fico feliz ao perceber que sentem orgulho a cada conquista que faço, saibam que todas elas são dedicadas a vocês.

À Rosa que com sua simplicidade e orações, sempre me dirigiu palavras de incentivo. Aos meus amigos Julienny (Jú), Daniela (Dani), Évilla (Fofuxa), Filipe (Ingua), Jean (Je), Carlos (IC), Poliana (Matilde) e Tatiana (Tati) pelos conselhos, desabafos e momentos de descontração.

À minha orientadora, prof. Dr. Kátia Karina, por seu exemplo de profissionalismo, seriedade, dedicação e comprometimento com aquilo que faz. Agradeço pela confiança que me foi dada, pela paciência e pelo incentivo durante a pós – graduação. A minha co – orientadora, prof. Ma Bárbara, pela disponibilidade, paciência e correções tão valiosas.

Agradeço a disposição dos membros da banca examinadora para avaliar e discutir o presente trabalho.

Aos docentes e funcionários da pós – graduação em Genética, do Departamento de Biologia da PUC – GO.

À todo pessoal do laboratório Replicon. Aos técnicos Cristiano, Damiana e Eduardo pelos serviços prestados no laboratório e principalmente, pela amizade. Aos professores Daniela, Cláudio e Peixoto pela disponibilidade e auxílio prestado durante os momentos de dúvidas na execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Replicon, em especial Andréia, Huguinho, Hugo, Caio, Vanessa, Higor (s), Macks, Manuela, Carol, Emília, Silonardo; ao grupo batizado de “Katitas” (os) Andréia, Constanza, Iasmim, Lília, Rita e Suelene; e aos mais recentes Andréa, Débora, José Vitor, Judas, Kleber, Nathalie, Pâmela e Rayana, obrigada pela amizade, os bons momentos, as conversas, pelo companheirismo e sobre tudo pelo convívio dentro e fora do Replicon.

Há tantas pessoas a quem devo agradecer, mas como seria muito difícil citar todas, uma a uma, fica aqui minha eterna gratidão àqueles que diretamente ou indiretamente ajudaram – me a escrever parte dessa história!

*Muito Obrigada!*

## SUMÁRIO

FIGURA, TABELAS E ANEXOS .....	ix
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1– INTRODUÇÃO.....	16
1.1 – ENDOMETRIOSE.....	16
1.1.1– Fisiopatologia.....	16
1.1.2– Definição da endometriose.....	16
1.1.3– Sintomatologia.....	17
1.1.4– Epidemiologia.....	18
1.1.5– Características morfológicas.....	18
1.1.6– Classificação da endometriose.....	19
1.1.7– Tipos de endometriose.....	19
1.1.7.1– Endometriose peritoneal ou superficial.....	19
1.1.7.2– Endometriose ovariana.....	20
1.1.7.3– Endometriose pélvica profunda.....	20
1.1.8– Etiologia da Endometriose.....	20
1.1.8.1– Teoria de Sampson.....	20
1.1.8.2– Teoria Mülleriana.....	21
1.1.8.3– Teoria da Metaplasia Celômica.....	21
1.1.8.4– Teoria da Disseminação Linfática e Hematogênica.....	22
1.1.8.5– Teoria da Disseminação Iatrogênica.....	22
1.1.8.6– Teoria Imunológica.....	22

1.1.9– Atividade Física e Endometriose .....	23
1.1.10– Idade.....	23
1.1.11– Etnia.....	24
1.1.12– Fumo e endometriose.....	24
1.1.13– Fatores familiares.....	25
1.1.14– Fatores genéticos.....	26
1.1.14.1– <i>p53</i> .....	27
1.1.14.2– PROGINS.....	28
1.1.14.3– Receptor RE $\beta$ .....	29
1.1.14.4– CYP1A1.....	29
1.1.15– Diagnóstico.....	30
1.1.16– Tratamento.....	31
1.1.17– Endometriose e infertilidade.....	34
1.1.18– Câncer ovariano e endometriose.....	35
1.1.19– Componentes ambientais.....	37
1.1.20– Xenobióticos.....	38
1.1.21– Sistema Glutationa S-transferase (GST).....	41
1.1.21.1– GSTM1 e GSTT1.....	43
2– JUSTIFICATIVA.....	45
3– OBJETIVOS.....	47
3.1– Objetivo geral.....	47
3.2– Objetivos específicos.....	47
4– MATERIAS E MÉTODOS.....	48
4.1– Casuística.....	48
4.2– Extração do DNA genômico.....	48

4.3– Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48
4.4– Análise dos resultados.....	52
5– RESULTADOS.....	54
6– DISCUSSÃO.....	65
7- CONCLUSÃO.....	71
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9- ANEXOS.....	84

## FIGURA, TABELAS E ANEXOS

### FIGURA

**Figura 1:** Figura 01: Gel de agarose 2% mostrando ampliações para o polimorfismo no códon 72 do gene *p53*. Nas colunas de 1 a 3 estão amostras de pacientes que amplificaram a região do polimorfismo no códon 72 do gene *p53*. A paciente 1 é homocigoto Arg/Arg (141pb), paciente 2 homocigoto Pro/Pro (177 pb) e a paciente 3 é heterocigoto Arg/Pro (177 e 141 pb). O padrão de peso molecular (Ld) utilizado nesta análise foi de 100pb (Ribeiro Júnior, 2009).

### .TABELAS

**Tabela I** - Sequência nucleotídica dos primers GSTT1, GSTM1 e ZFX/Y.

**Tabela II** - Protocolo para a amplificação do polimorfismo GSTM1

**Tabela III** - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers GSTM1.

**Tabela IV** - Protocolo para a amplificação do polimorfismo GSTT1.

**Tabela V** - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers GSTT1.

**Tabela VI** - Protocolo para a amplificação do polimorfismo no códon 72 do *p53*-Pro

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

**Tabela VIII** - Comparação das variáveis das médias idades das pacientes com endometriose e controle (sem endometriose).

**Tabela IX** - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 da glutathione S-transferase no grupo de mulheres estudadas (endometriose + controle)

**Tabela X** - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 da glutathione S-transferase nos grupos endometriose e controle

**Tabela XI** - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 entre os grupos endometriose infértil (endo+inf) e controle.

**Tabela XII** - Distribuição dos genes GSTM1 e GSTT1 entre os grupos endometriose fértil (endo+fert) e controle.

**Tabela XIII** - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 nos grupos endometriose fértil (endo+fert) e infértil (endo+inf), correlacionada com a classificação da endometriose (Grau I, II, III e IV).

**Tabela XIV**- Comparação da variável etnia com os genótipos do polimorfismo GSTM1 e GSTT1 nos grupos estudados, endometriose e controle (endo+controle).

**Tabela XV** - Comparação do uso de anticoncepcional nos grupos de mulheres com endometriose inférteis (endo+inf) e férteis (endo+fert) e o grupo controle.

**Tabela XVI** - Comparação da variável atividade física com o polimorfismo GSTM1 e GSTT1 nos grupos endometriose infértil (endo+inf) e fértil (endo+fert) e grupo controle.

**Tabela XVII** - Comparação da variável hábito de fumar com os polimorfismos GSTM1 e GSTT1 nos grupos endometriose infértil (endo+inf) e (endo+fert) e grupo controle.

**Tabela XVIII** - Comparação da variável hábito de ingerir bebida alcoólica com os polimorfismo GSTM1 e GSTT1 nos grupos endometriose infértil (endo+inf) e fértil (endo+fert) e o grupo controle.

**Tabela XIX** - Distribuição dos polimorfismos GSTM1, GSTT1 e *p53* nos grupos endometriose (endo) e controle.

## **ANEXOS**

**Anexo I** – Questionário.

**Anexo II** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento.

**Anexo III** - Consentimento da Participação da Pessoa como Sujeito.

## **ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

### **ABREVIACÕES**

**1p-** Braço curto do cromossomo 1

**1p13.3-** Braço curto do cromossomo 1, região 1 banda 3, sub-banda 3

**22q-** Braço longo do cromossomo 22

**22q11.2-** Braço longo do cromossomo 11, região 1 banda 1, sub-banda 2

**AC-** Anticoncepcional

**AF-** Atividade física

**Arg-** Arginina

**C → G-** Transição de uma citosina para uma guanina

**CYPs-** Citocromo p450

**DDE-** Diclorodifenildicloroetileno

**DDT-** Ditiotreitól

**DNA-** Ácido desoxirribonucléico

**DP-** Desvio padrão

**Endo+fert-** Endometriose fértil

**Endo+inf-** Endometriose infértil

**ER $\alpha$ -** Receptor de estrogênio alfa

**ER $\beta$ -** Receptor de estrogênio beta

**GnRH-** Hormônio liberador de gonadotrofinas

**GO-** Goiás

**GSH-** Glutationa reduzida

**GST-** Glutationa S-transferase

**GSTM1-** Glutationa S-transferase M1

**GSTP1-** Glutationa S-transferase P1

**GSTT1-** Glutathione S-transferase theta 1

**GSTZ1-** Glutathione S-transferase Z1

**HAP-** Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

**Heptacloro-** Composto organoclorado que é usado como inseticida

**Kepone-** Inseticida sintético clordecona

**Lys** → **Asn-** Transição de uma lisina para uma asparagina

**P53-** Proteína p53

**PCB-** Bifenilos policlorados

**PCR-** Reação em cadeia da polimerase

**PF-** Fluido peritoneal

**PR-** Receptor de progesterona

**PRA-** Receptor de progesterona A

**PRB-** Receptor de progesterona B

**Pro-** prolina

**PROGINS-** Gene dos receptores de progesterona

**ROS-** Espécies reativas de oxigênio

**SO-** Estresse oxidativo

**VDS-** Sistema de Vídeo Documentação

$\chi^2$ - Teste qui - quadrado

**ZFX/Y-** Marca regiões dos cromossomos sexuais

## **SÍMBOLOS**

% Porcentagem

= Igual

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. Peróxido de hidrogênio

**HO** - Radical hidroxila

**O<sub>2</sub>**. Ânio superóxido

**°C**- Graus Celcius

**pb**- Pares de base

**α**- Alfa

**β**- Beta

## RESUMO

A endometriose é uma patologia ginecológica benigna dependente de estrógeno, que afeta 10% das mulheres em idade reprodutiva, é caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Sua etiologia permanece desconhecida, com isso um número cada vez maior de pesquisas tem sido realizado na procura de associações entre endometriose e alterações ou polimorfismo em genes candidatos, entre esses genes estão o GSTM1 e o GSTT1. Este estudo teve como objetivo verificar a possível correlação entre a endometriose e os polimorfismos de presença/ausência GSTM1 e GSTT1. Nós analisamos a frequência dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em 50 mulheres diagnosticadas com endometriose e no grupo controle, com 46 mulheres sem queixas relacionadas com a patologia, os genótipos para esses polimorfismos foram determinados por PCR. Encontramos maior frequência de ausência dos genes GSTM1 (61%) e de presença do GSTT1 (55%) no grupo de mulheres estudadas, o que corroboram com a literatura. Quando relacionamos endometriose com os polimorfismos estudados verificamos que o grupo endometriose apresentou maior presença de ambos os polimorfismo 50% GSTM1 e 68% GSTT1, enquanto que no grupo controle verificou-se o contrário, maior ausência dos polimorfismos, 74% do GSTM1 e 59% do GSTT1, mostrando que esses polimorfismos não tem relação com a proliferação da endometriose.

Palavras chaves: Endometriose, infertilidade, glutathione S-transferase, GSTM1 e GSTT1

## ABSTRACT

Endometriosis is a benign gynecological pathology dependent on estrogen, which affects 10% of women of reproductive age, it is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Its etiology remains unknown, thus an increasing number of researches have been conducted in the search for associations between endometriosis and alterations or polymorphisms in candidate genes, among these genes are the GSTM1 and GSTT1. This study aimed to verify the possible correlation between endometriosis and polymorphisms of presence / absence of GSTM1 and GSTT1, and the association between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and *p53* Arg / Pro. We analyzed the frequency of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in 50 women diagnosed with endometriosis and in control group with 46 women without complaints related to this pathology, the genotypes for these polymorphisms were determined using PCR. We found an increased frequency of absence of GSTM1 (61%) and presence of GSTT1 genes (55%) in the group of women studied, which corroborate with the literature. When we relate the endometriosis with the studied polymorphisms we verified that the endometriosis group had a higher presence of both polymorphisms 50% of GSTM1 and 68% of GSTT1 whereas in the control group there was the opposite, a higher absence of polymorphisms, 74% of GSTM1 and 59% of GSTT1, showing that these polymorphisms has no relation to the proliferation of endometriosis, however the analysis of the pathology with the association of GSTM1, GSTT1 polymorphisms with the *p53* codon 72 gene was statistically significant.

Keywords: Endometriosis, infertility, glutathione S-transferase, GSTM1 and GSTT1

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. ENDOMETRIOSE**

### **1.1.1- Fisiopatologia**

A endometriose é uma doença ginecológica benigna dependente de estrogênio, que afeta 10% das mulheres em idade reprodutiva, é caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, e está associada a dor pélvica, dismenorrea e infertilidade. Apesar dos vários estudos feitos ao longo dos anos, a etiologia e patogenia da endometriose ainda não são claras (Minici et al, 2008). A relação entre o estágio da patologia e infertilidade também continua incerto, já que, alguns pesquisadores não encontraram nenhuma associação entre o estágio e a subfertilidade, enquanto outros relatam que a fertilidade diminui com o aumento da severidade da doença (Sinaii et al, 2008).

A endometriose provavelmente inclui fatores hormonais, anômicos, genéticos e imunológicos. Os sinais e sintomas surgem de sangramentos cíclico para os tecidos circundantes, resultando em inflamação, cicatrizes e aderências. O risco de desenvolver endometriose pode estar associado a fatores que aumentam o volume, a frequência e a duração da menstruação retrógrada, o que promove a implantação e crescimento das placas de endométrio. Também há indícios fortes de que a endometriose é influenciada por hormônios esteróides (Vitonis et al, 2010).

### **1.1.2- Definição da endometriose**

Endometriose é a presença de glândulas estromais funcionais do endométrio em locais fora da cavidade uterina. Há essencialmente três diferentes formas de endometriose: endometriose retovaginal, endometriose ovariana cística e a endometriose peritoneal, cada uma com sua própria patogenia, sintomatologia, história natural da doença e, portanto, o tratamento (Dunselman et al, 2001). Sua etiologia é desconhecida, embora uma origem multifatorial, resultante da contribuição de fatores imunológicos, genéticos e ambientais, é considerada a mais plausível (Porpora et al, 2009).

O tecido da endometriose é biologicamente o mesmo do tecido endometrial basal. Focos de endometriose consistem de glândulas, as células do estroma, e do músculo liso, que são fornecidos pelos nervos (neurogênese), vasos linfáticos e vasos sanguíneos (angiogênese) (Halis et al,2010). Os principais processos patológicos associados com endometriose são a inflamação e fibrose peritoneal, e a formação de aderências e endometriomas (cistos ovarianos benignos) (Aris, 2010).

### **1.1.3- Sintomatologia**

A apresentação clínica das mulheres com endometriose é variada. Muitas mulheres são assintomáticas e são reconhecidas como tendo endometriose somente quando elas estão sendo investigadas para a infertilidade. A endometriose pode se apresentar com qualquer combinação de dismenorréia (menstruação dolorosa), dispareunia de profundidade (dor durante o ato sexual), lombalgia (dor que ocorre nas regiões lombares inferiores), dor pélvica (dor na região da pelve), massa pélvica (pode ser um endometrioma, ou uma massa não relacionada com a doença) ou infertilidade (incapacidade temporária ou permanente de gerar um filho ou de levar uma gravidez até ao seu termo natural). A dor pélvica pré-menstrual geralmente aumenta. Pacientes também podem ter menorragia (é o sangramento excessivo e/ou prolongado durante o período menstrual) ou metrorragia (hemorragia uterina em qualquer outro momento que não a menstruação). Dor no intestino e na bexiga às vezes são sintomas presentes, fazendo a endometriose difícil de distinguir de síndrome do intestino irritável ou cistite intersticial (Jackson e Telner, 2006).

Segundo Passos e colaboradores (2000), a endometriose seria a causa de subfertilidade (quando um casal necessita de mais tempo que o habitual para conseguir conceber naturalmente uma gravidez) em mulheres com a patologia, e que a infertilidade seria causada pela associação da endometriose com outros fatores, sendo assim a relação da endometriose com infertilidade ainda não foi totalmente esclarecida, visto que em muitos casos não existe nenhuma distorção anatômica importante. Foi constatado que pacientes com endometriose tem cerca de 20 vezes mais chance de serem inférteis do que mulheres sem a patologia.

Como os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na endometriose ainda não foram descobertos, a classificação desta patologia evoluiu de transtorno local para

complexo, doença crônica sistêmica (Zhao et al, 2009). O risco de se desenvolver esta patologia aumenta com a idade reprodutiva, o início pode ocorrer a partir da menarca, mas após a menopausa é raro, indicando que é uma condição dependente de estrógeno (Montgomery et al, 2008). Há situações que aumentam a frequência da endometriose, como histórico familiar (irmãs ou mães com endometriose), principalmente em suas formas mais graves (Passos et al, 2000).

#### **1.1.4- Epidemiologia**

A prevalência da endometriose em mulheres assintomáticas é de 2-50% dependendo do critério de diagnóstico utilizado e da população estudada, já nas mulheres com dismenorréia é de 40-60%. Em mulheres com subfertilidade a prevalência é de 20-30% (Farquhar, 2007). A endometriose é a causa mais comum de dor pélvica e ocorre em 13-33% das mulheres com infertilidade (Kyama et al, 2003) e sua prevalência e gravidade são relatados a aumentar nos países em desenvolvimento (Porpora et al, 2009).

Entre as mulheres que sofrem de infertilidade 20% a 48% têm endometriose. Entre as mulheres jovens com dor pélvica crônica que não respondem à terapia hormonal ou a tratamento com antiinflamatórios não-esteróides, a prevalência da endometriose é cerca de 70% (Halis et al, 2010).

#### **1.1.5- Características morfológicas**

A endometriose é caracterizada como a presença de lesões ou nódulos em tecidos que são histologicamente semelhantes ao do endométrio, mas que estão localizados fora da cavidade uterina (Fraser, 2008). Para realizar o diagnóstico da endometriose é necessário recorrer a técnicas invasivas como laparoscopia e laparotomia, para realização de exame histopatológico, o que dificulta ou até mesmo impossibilita a realização de estudos controlados sobre o comportamento dos implantes do endométrio (Shor et al, 1999). As lesões causadas pela endometriose podem ser avaliadas em seus diferentes estágios de evolução, tendo portanto diferentes aspectos (Passos et al, 2000).

Segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (2007) os implantes de endometriose precoce parecem pequenas manchas planas, bolhas ou manchas, sobre a superfície pélvica. A mancha pode ser clara, branca, marrom, vermelha, preta ou azul. A

gravidade e o curso da endometriose são altamente imprevisíveis. Algumas mulheres podem ter pouco implante de endometriose sobre a superfície da pélvis, o peritônio ou órgãos pélvicos, ou podem invadir o peritônio e crescer como nódulos. A endometriose pode se desenvolver na superfície do ovário como implantes ou invadir o interior do ovário e desenvolver um cisto cheio de sangue chamado de endometrioma ou “cisto chocolate”. Cistos de chocolate são assim chamados porque ao longo do tempo o sangue que contêm, escurece a um avermelhado profundo, cor marrom. Esses cistos podem ser tão pequenos quanto uma ervilha ou crescer até ser maior do que uma toranja.

Depois da formação de cisto de chocolate, a fibrose resultante do processo inflamatório e da redução de vasos sanguíneos no foco endometriótico torna-se opaca, com aspecto cicatricial, sendo denominada de lesão branca. Acredita-se que nesta última fase as lesões possam permanecer em estado latente (Nisolle e Donnez, 1997).

#### **1.1.6- Classificação da endometriose**

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (2007), classifica a endometriose em quatro estágios, I-mínimos, II suave, III moderada e IV grave, dependendo da localização, a extensão e a profundidade dos implantes de endometriose, a presença e severidade das aderências, presença e tamanho de endometriomas ovarianos. A maioria das mulheres, tem endometriose mínima ou leve, que é caracterizada por implantes superficial e aderências leves. No entanto, este grau de endometriose está fortemente associado com a infertilidade, dismenorréia, dor pélvica crônica. Endometriose moderada e severa é caracterizada por cistos de chocolate e adesões mais severas.

#### **1.1.7- Tipos de endometriose**

##### **1.1.7.1- Endometriose peritoneal ou superficial**

Endometriose peritoneal ou superficial são lesões disseminadas no peritônio. Inicialmente são caracterizadas por uma superfície vermelho claro, devido à formação ativa de novos vasos sanguíneos, podendo progredir para lesões brancas bem marcadas e em seguida ter características maduras com uma cor “negra” devido à retenção de sangue depositado na superfície peritoneal. Esta progressão da endometriose peritoneal é estimada para durar aproximadamente dez anos (Fraser, 2008).

### **1.1.7.2- Endometriose ovariana**

Endometriose ovariana caracteriza-se pelo implante superficial nos ovários, podendo levar a formação de cistos, sendo uma das manifestações típicas da endometriose. Cistos de ovário de endométrio, uma das manifestações típicas da endometriose, são gerados pela retenção de hemorragias cíclicas e são classificadas como lesões tumorais. Endometriomas contendo grandes volumes de produtos derivados do sangue menstrual alterado, que normalmente só são vistos dentro dos ovários e podem crescer até 10cm de diâmetro, são na verdade pseudocistos que se invaginam na superfície do ovário à partir de lesões aderentes na parede pélvica lateral (Jimbo et al, 1997; Fraser, 2008).

### **1.1.7.3- Endometriose pélvica profunda**

De acordo com Jenkins e colaboradores, apud BAZOT e colaboradores (2007), a endometriose pélvica profunda é definida como a presença de implantes endometriais, contendo uma grande quantidade de tecido fibroso e hiperplasia muscular a baixo do peritônio. A endometriose pélvica profunda envolve em ordem decrescente de frequência, os ligamentos do sacro, cólon retrósigmóide, vagina e a bexiga.

### **1.1.8- Etiologia da Endometriose**

Embora a etiologia da endometriose ainda seja enigmática e complexa, há evidências crescentes de que a endometriose seja parte de uma síndrome de disfunção uterina reprodutiva. Para a prevenção de complicações, é muito importante que o diagnóstico seja realizado o quanto antes (Zhao et al, 2009; Brosens e Benagiano, 2011). Fatores como estilo de vida e ambientais também foram identificados como fatores de risco, embora não tenham sido a origem implicado (Hediger et al, 2005). Esclarecer a etiologia genética da endometriose teria implicações para o diagnóstico, a identificação de mulheres em risco e o desenvolvimento de terapêuticas específicas (Tempfer et al, 2009).

#### **1.1.8.1- Teoria de Sampson**

A teoria mais aceita para a patogênese da endometriose é a de Sampson (1927), conhecida como menstruação retrógrada, segundo ele pedaços de tecido endometrial produzidos pela menstruação da mucosa que reveste a cavidade uterina e também focos de

endométrio ectópico, nem sempre são eliminados, mas às vezes são implantados na superfície endotelial das veias próxima a seios venosos.

Cramer e colaboradores (1996), apóiam o conceito que endometriose está conectada com a menstruação retrógrada, visto que, os erros no metabolismo da galactose podem estar associados com defeitos na canalização do colo do útero, produzindo a obstrução do fluxo, relacionado a menstruação retrógrada, desenvolvendo assim a endometriose.

Apesar da teoria da menstruação retrógrada de Sampson (1927), ser a mais aceita, esse não pode ser o único mecanismo de desenvolvimento, porque a menstruação retrógrada ocorre em quase todas as mulheres e a maioria não desenvolvem as características clínicas da endometriose. Parece provável que tem de haver alterações da função, quer no endométrio eutópico que faz o revestimento do útero de mulheres predispostas à endometriose e/ou insuficiência de mecanismos de vigilância imunológico, normalmente responsável pelo reconhecimento e retirada de fragmentos do endométrio, que encontram seu caminho para a cavidade peritoneal, fatores ambientais e aumento da capacidade angiogênica (Fraser, 2008; Montgomery et al, 2008).

#### **1.1.8.2- Teoria Mülleriana**

A teoria Mülleriana postula que a endometriose é causada por defeitos durante a embriogênese. De fato, durante a fase embrionária, as células primitivas migram e se diferenciam para formar os órgãos pélvicos. Em particular, os dutos de Müller, que dão origem ao trato reprodutivo feminino, incluindo as trompas, útero, colo do útero e vagina anterior. Esta organogênese é controlada e dirigida por um sofisticado, mas não ainda completamente compreendida, sistema fetal, incluindo a regulação do hormônio anti-Mülleriano que faz a sinalização da via. Especula-se que a diferenciação aberrante ou a migração dos ductos de Müller pode causar disseminação de células no trato ou na via migratória de organogênese fetal através do assoalho pélvico posterior (Signorile et al, 2009).

#### **1.1.8.3- Teoria da Metaplasia Celômica**

Novak, Myer e outros pesquisadores elaboraram a teoria da metaplasia celômica, baseada no fato de que o epitélio celômico dá origem a todas as estruturas derivadas dos ductos de Mullerian, podendo sofrer, sob certos estímulos, mudanças metaplásicas, o que

representaria o desenvolvimento do endométrio (Moore, 1970). Essa teoria sugere modificações celulares devido aos resultados epigenéticos ou alterações genéticas na transformação de um tipo específico de tecido Müller em tecido endometrial (Klemmt et al, 2006). A teoria da metaplasia celômica afirma que as células peritoneais são embriologicamente derivadas do epitélio celômico, que é totipotencial e retém a capacidade de produzir endométrio quando adequadamente estimulado, podendo este estímulo ser hormonal, inflamatório ou desconhecido (Witz et al, 2002).

#### **1.1.8.4- Teoria da Disseminação Linfática e Hematogênica**

A teoria dos Implantes ectópicos engloba a hipótese canalicular descrita por Sampson, em 1927, de que através da menstruação retrógrada as células endometriais seriam implantadas na cavidade peritoneal. Outros mecanismos, tais como a disseminação linfática, vascular ou até mesmo iatrogênica, partem do mesmo princípio da teoria descrita por Sampson, ou seja, o implante de células endometriais na superfície peritoneal (Passos et al, 2000). Halban (1924), apud BIANCO et al (2010), sugeriu que a endometriose poderia se originar por disseminação de células endometriais pelo sistema linfático.

#### **1.1.8.5- Teoria da Disseminação Iatrogênica**

Implantes endometrióticos extrapélvicos podem ocorrer em tecido celular subcutâneo de cicatrizes cirúrgicas ou adjacências, seguindo procedimentos obstétricos e ginecológicos, sendo mais comuns após procedimentos realizados durante a gestação (Nominato et al, 2007).

#### **1.1.8.6- Fatores Imunológicos**

Uma etiologia/imunológica inflamatória pode ser a causa da patologia, como demonstrado pelo aumento das concentrações de macrófagos ativados, citocinas, células T e B. Os fragmentos endometriais descamados durante a menstruação e depositados na cavidade peritoneal, implantam, desenvolvem e se proliferam em lesões de endometriose. O desenvolvimento da endometriose pode ser influenciado, pela quantidade e qualidade de células endometriais no fluido peritoneal (PF), e por fatores imunes, incluindo o aumento da atividade inflamatória no PF, prejuízo no reconhecimento imunológico e eliminação de células endometriais ectópicas, e formação de anticorpos (Kyama et al, 2003).

### **1.1.9- Atividades Físicas e Endometriose**

No estudo feito por Dhillon e Holt (2003), observou-se uma significativa diminuição de 70% de risco de endometriose associada a prática regular de atividade física. Um estudo de base populacional, transversal, em um condado da Noruega não encontrou nenhuma associação entre endometriose e atividade física, ao passo que dois estudos caso-controle nos Estados Unidos relataram uma diminuição do risco de endometriose associada ao exercício extenuante, pelo menos, três horas por semana.

Cramer e colaboradores (1986), encontraram dados que indicam que mulheres que exercem atividades físicas regularmente apresentam um risco significativamente menor de endometriose do que as mulheres sem o hábito. O exercício físico regular se traduziu em um efeito protetor para a endometriose.

### **1.1.10- Idade**

No estudo feito por Cramer e colaboradores (1986), foi encontrado uma tendência de endometriose em mulheres com menarca precoce, quando comparado com o grupo controle do estudo. Contudo estudos mostram que o risco de endometriose não aumenta linearmente com a idade. No estudo de Houston's, a taxa clínica de casos de incidência teve uma subida acentuada até a idade de 35 anos e depois caiu rapidamente, após a idade de 44,11 (Mangtani e Booth, 1993).

A prevalência da endometriose pélvica é alta, afetando aproximadamente 6 a 10% de mulheres em idade reprodutiva. Embora a endometriose tenha sido associada com a ocorrência de ciclo menstrual, pode afetar entre 2 a 5% das mulheres pós-menopausa, e geralmente ocorre como um efeito colateral do uso de hormônios (Manero et al, 2009).

Ventolini e colaboradores (2005) fizeram um estudo, a longo prazo, com 28 mulheres com diagnóstico de endometriose na adolescência comparando as formas graves e leves de endometriose e sua fecundabilidade, embora a população da amostra seja relativamente pequena, confirmam o fato observado na população adulta, que existe uma relação inversa entre a progressão da doença endometriose e a fecundabilidade, ou seja, com o progresso da doença a taxa de fecundabilidade diminui.

### **1.1.11- Etnia**

Em um estudo feito nos Estados Unidos, mostrou que a endometriose está relacionada com a etnia, sendo rara a prevalência em pessoas negras. Tendo uma maior prevalência no sudeste Asiático e Japão (Mangtani e Booth, 1993).

No levantamento feito por Weed (1995), o motivo da baixa incidência de endometriose entre as mulheres negras se deve ao fato que as publicações feitas até o período eram com pacientes atendidas em clínicas particulares, onde a maioria eram pacientes brancas. No entanto um levantamento das pacientes negras atendidas em clínicas particulares, em Nova Orleans, revelou apenas quatro casos comprovados de endometriose em um período de 10 anos, o que é consideravelmente menor do que poderia ser esperado se a real incidência de endometriose em negros fosse semelhante a de brancos. A incidência de endometriose relatada é baixa em mulheres filipinas, e nas mulheres indianas do México. Essa baixa incidência tem sido atribuída ao casamento precoce e as famílias numerosas.

Missmer e colaboradores (2004), mostraram que a endometriose tem uma incidência 40% mais baixa em mulheres afro – americanas ou hispânicas comparadas com mulheres caucasianas; o mesmo não foi encontrado quando comparado mulheres caucasianas com asiáticas. Tem sido argumentado que a relação com ascendência africano-americano não é legítima, devido ao acesso a cuidados de saúde ser menor e a má classificação do resultado, porque as mulheres das minorias raciais são muitas vezes mal diagnosticadas, como portadores de doença inflamatória pélvica, em vez de endometriose.

### **1.1.12- Fumo e endometrioses**

Recentes estudos têm abordado as questões de exposição à fumaça de cigarro e as diversas facetas da reprodução, incluindo atraso no tempo de concepção, os efeitos no ovário e menopausa precoce, falhas de implantação, restrição de crescimento fetal e retardo do crescimento, anormalidades placentárias, fecundidade reduzida, anomalias congênitas, e os efeitos sobre a reprodução masculina (Talbot e Riveles, 2005).

Segundo Hediger e colaboradores (2005), o consumo de álcool e cafeína, têm sido associados com um risco aumentado na patologia, e o cigarro, com um efeito protetor estatisticamente em alguns estudos. Todavia, a interpretação dos resultados é seriamente

limitada pela exposição inconsistente quanto à estimativa de risco (por exemplo, diferentes períodos de tempo antes do diagnóstico dos casos e um intervalo de tempo de referência comparável para controles) ou a inclusão / omissão do estudo de co-variáveis relevantes em modelos multivariados.

Embora no trabalho de Cramer e colaboradores (1986), houve poucas fumantes entre as pacientes, um grupo identificado como tendo um risco significativamente menor para a endometriose eram fumantes que haviam começado antes da idade de 17 anos e fumava um maço ou mais por dia.

### **1.1.13- Fatores Familiares**

Existe um crescente corpo de evidências para um papel de fatores genéticos na patogênese da endometriose, baseada principalmente em relatos de agrupamento familiar e prevalência aumentada entre parentes de primeiro grau. O risco para parentes de primeiro grau de pacientes para o desenvolvimento de endometriose foi relatado ser 4-8 vezes maior do que a população em geral (Stefansson et al, 2002).

Vários estudos mostram que a endometriose está relacionada com a herança genética. Simpson conduziu um estudo em Norway, que mostrou um alto índice de mães e irmãs apresentando endometriose, e uma porcentagem pequena de irmãs de mulheres que não tinham endometriose, afetadas. No estudo feito por Kennedy para confirmar a tendência familiar da endometriose, foi possível concluir que irmãs mais velhas desenvolvem os sintomas aproximadamente cinco anos antes que suas irmãs jovens, sugerindo que a exposição a um agente ambiental comum é improvável (Bischoff e Simpson, 2000).

Um estudo realizado em gêmeas, demonstrou que a incidência de endometriose em gêmeos monozigóticos foi duas vezes maior que em gêmeos dizigóticos. Além disso, foi demonstrado que a gravidade da endometriose é maior entre pacientes com história familiar positivo. Assim, pode-se concluir que se uma mulher tem endometriose, o risco de que, suas parentes, de primeiro grau também tenham a patologia, pode ser 4-7 vezes maior que a da população em geral (Nouri et al, 2010).

Endometriose é claramente herdável, mas a forma como ela é herdada ainda não é comprovada, sendo que a herança poligênica é mais provável que a Mendeliana. Fatores ambientais apresentam papel comum em todas as doenças, e provavelmente também estão envolvidos na endometriose, devido ao mecanismo genético ser considerado mais

corretamente poligênico/ multifatorial (Bischoff e Simpson, 2000). A endometriose é cada vez mais reconhecida como uma característica complexa, cujo desenvolvimento é influenciado pela interação entre vários genes e fatores ambientais (Attar et al, 2010).

Um forte componente familiar tem sido reconhecido por muitos anos, como uma jovem que tem uma irmã ou mãe com a doença comprovada, com um risco oito vezes maior de desenvolver endometriose do que uma mulher sem antecedentes familiares. A predisposição familiar é provavelmente influenciada por uma multiplicidade de genes com funções diferentes, que se têm revelado difíceis de identificar (Fraser, 2008).

Stefansson e colaboradores (2002), fizeram um estudo de base populacional, utilizando uma base de dados de genealogia extensa, para analisar a contribuição genética para a endometriose, e concluiu que um fator genético está presente, com um risco elevado nos parentes mais próximos e distantes, e um fator de parentesco definida com a contribuição da herança materna e paterna.

Nouri e colaboradores (2010), fizeram um estudo com 140 pacientes, sendo que 80 com endometriose confirmada por laparoscopia e biópsia histológica e 60 pacientes controle, onde não foi encontrado endometriose durante a laparoscopia, para avaliar o risco de endometriose familiar entre as parentes mulheres de primeiro, segundo e terceiro grau. Não foram encontrados dados estatisticamente significantes, para comprovar a herança, contudo foi possível notar uma tendência para o aumento da incidência familiar de endometriose. Em contraste com a literatura, foi encontrado um aumento menos dramático do risco familiar para o desenvolvimento da endometriose.

#### **1.1.14- Fatores genéticos**

Recentemente, várias linhas de estudos de genética, revelaram associação entre o desenvolvimento da endometriose e de certos polimorfismos genéticos. No entanto, os genes que tem papel na susceptibilidade para o desenvolvimento e progressão da endometriose ainda não são conhecidos (Attar et al, 2010).

Encontrar variantes genéticas que contribuem para doenças complexas, como a endometriose, diabetes ou doenças cardíacas é muito mais difícil porque a contribuição de genes individuais é pequeno. Muitos genes contribuem para o risco de um indivíduo desenvolver a patologia, e o risco é muitas vezes modificado pelo ambiente. No entanto, doenças comuns, de saúde pública apresentam uma carga de doenças mendelianas maior, e

há grande esforço internacional para definir a contribuição genética para estas doenças. Apesar dessas limitações, o mapeamento do gene continua a ser uma abordagem importante para entender os caminhos envolvidos na etiologia de doenças complexas, incluindo endometriose (Montgomery et al, 2008).

Os avanços na genética humana resultaram na identificação de genes responsáveis pela maioria dos mais conhecidos distúrbios de gene único, utilizando a análise de ligação. Desordens em um único gene respondem por cerca de 1% das doenças humanas. No entanto, a grande maioria das doenças humanas é herança poligênica, provocada por uma infecção ou outros agentes externos, ou é um produto das interações entre fatores genéticos e externos (Stefansson et al, 2002).

Um problema particular na interpretação dos resultados de estudos de associação genética em endometriose está ligado ao fato de que, esta não é uma característica monogênica, mas uma característica complexa. Portanto, vários fatores genéticos podem vir a ter um efeito com um nível adicional de variação, em relação a tamanhos e efeito individual. Especialmente efeitos de tamanho pequeno, podem ser facilmente perdidos em estudos individuais com amostras de tamanhos pequena. Problemas metodológicos comuns em estudos de associação genética incluem o tamanho reduzido da amostra, comparações múltiplas, diferentes origens étnicas dos sujeitos do estudo, variando definições da doença e critérios de inclusão / exclusão e de viés (Tempfer et al, 2009).

#### **1.1.14.1- *p53***

Um marcador molecular, bastante estudado e um de nosso objeto de análise é o gene supressor de tumor *p53* que encontra-se situado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1), tendo como seu produto de transcrição uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (kDa), denominada proteína 53 (P53) em consequência do seu peso molecular. Esse gene possui 20 Kb e é composto por 11 éxons que codificam RNA mensageiro de 2,8Kb, sendo o primeiro não codificante e altamente conservado, apresentando homologia estrutural entre as espécies (Almeida et al, 1986).

A perda da função da proteína P53 pode ocorrer nas seguintes situações: a) por alteração genética; b) interação da proteína P53 com proteínas virais, c) interação da proteína P53 com outras proteínas regulatórias do ciclo celular e d) alteração da localização celular. As alterações genéticas podem ser: mutação pontual (do inglês

*missense*), deleção gênica (do inglês *non sense*) de um ou dois alelos do gene *P53* e inserção de nucleotídeos na seqüência de DNA (Silva et al, 2003).

Os polimorfismos consistem em variações genéticas encontradas em pelo menos 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 são estatísticas e independentes da presença de doença ou da predisposição a condições patológicas (Pasternak, 2007).

Alterações genômicas podem representar eventos importantes no desenvolvimento da endometriose. O *p53* é um gene supressor de tumor, responsável pelo controle da regulação do crescimento celular e regulação do ciclo celular, onde ele está envolvido na inibição da proliferação celular, bem como na progressão de vários tipos de tumores. Duas variantes descritas no códon 72 do gene *p53* resultam da substituição de um único nucleotídeo, resultando na presença de prolina (*p53pro*) ou arginina (*p53arg*) no produto da proteína. A mutação do *p53* foi encontrada na endometriose. Anomalias e aberrações cromossômicas relacionadas à *p53*, podem estar associada com a transformação maligna da endometriose ovárica. Contudo alguns pesquisadores não detectaram alteração do polimorfismo da *p53* na patologia da endometriose (Ribeiro Júnior et al, 2009).

Hsieh e Lin (2006), em seu estudo encontraram resultados mostrando a associação entre o polimorfismo da *p53* no códon 72 e a endometriose, com uma proporção maior de expressão do alelo homozigoto prolina. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho feito por Ribeiro Júnior e colaboradores (2009), foi encontrado que a presença do alelo prolina está mais ligado aos pacientes com infertilidade e com um quadro clínico mais grave, sugerindo que o polimorfismo *p53* poderia ser usado como um marcador molecular para a endometriose associada a sintomas

#### **1.1.14.2- *PROGINS***

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, tem sido estudado em associação com afecções estrogênio-dependentes (Carvalho et al, 2004). Na pesquisa feita por Xu e colaboradores (2009), a inserção Alu do *PROGINS*, que está em desequilíbrio de ligação completa com o polimorfismo Val660Leu (rs1042838), foi associado com um risco aumentado de câncer endometrial em uma população brasileira (Xu et al, 2009).

A endometriose expressa células receptores de estrogênio (ER  $\alpha/\beta$ ) e progesterona (PR A/B) nas células e, portanto, respondem aos tratamentos endócrinos. (Halis et al, 2010). O receptor humano de progesterona (PR) é expresso em duas isoformas, PRA e PRB, que funcionam como fatores de transcrição ligante ativados. Estudos *in vitro* sugerem que as isoformas diferem funcionalmente e que a sua expressão relativa em uma célula-alvo pode determinar a natureza e a magnitude da resposta à progesterona (Mote et al, 2000).

No trabalho feito por Costa (dissertação Mgene, 2010), houve significância estatística que indicasse a associação entre o polimorfismo *PROGINS* e a patologia endometriose, pois a frequência dos genótipos polimórficos (A1/A2 e A2/A2) é duas vezes maior nas pacientes com endometriose do que no grupo controle analisado.

#### **1.1.14.3- Receptor *RE $\beta$***

A endometriose é uma doença dependente do estrogênio. Vários dos processos fundamentais envolvidos na função normal do endométrio, como a proliferação e vascularização são regulados pelo estrógeno. A ação do estrógeno é mediada por duas variantes do receptor de estrógeno denominado ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Critchley et al, 2006).

Estrógeno é conhecido como o fator mais importante que estimula o desenvolvimento da endometriose. A distribuição do estrogênio nos implantes de endometriose foi visto classicamente ser apenas através do sangue que circula de forma endócrina (Bulun et al, 1999).

No trabalho feito por Silva e colaboradores (2011), verificou-se que o polimorfismo do gene *RE $\beta$*  esta associado a endometriose, já que a frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene *RE $\beta$*  foi 9 vezes maior em pacientes com endometriose do que nas pacientes controles.

#### **1.1.14.4- *CYP1A1***

Os genes *CYP1A1* e *CYP1B1* da fase I codificam enzimas envolvidas na desintoxicação do metabolismo do estrogênio. Estudos em populações austríaca, indiana, chinesa, japonesa e taiwanesa não encontraram associação entre os polimorfismos conhecidos do gene *CYP1A1* e a suscetibilidade à endometriose (Guo, 2006). Em relação

às enzimas CYPs, uma das mais extensivamente estudadas é a *CYP1A1*. Um polimorfismo de restrição *MspI* (*CYP1A1m1*) na região 3' não codificante do gene, resultante da transição de uma timina para citosina (T→C), parece promover aumento da sua expressão (Nakata et al, 2004).

Souza (Mgene, 2011), estudou a associação do gene *CYP1A1m1* com endometriose, e encontrou que os polimorfismos W1/m1 e m1/m1 estão mais frequentes nas pacientes com quadro clínico mais severo da patologia.

### **1.1.15- Diagnóstico**

O diagnóstico da endometriose é feito geralmente com base no histórico clínico, os resultados de exame físico são geralmente normais. Os clínicos devem palpar de forma suave as massas uterinas anexiais, útero fixo retrovertido, massas pélvicas e nódulos ao longo dos ligamentos útero-sacral. A maioria das mulheres, têm resultados pélvicos normais. O achado mais comum é a sensibilidade à palpação do fundo do saco posterior. O exame físico também deve ser direcionado para afastar outras causas de dor pélvica, principalmente condições do intestino e da bexiga. Os exames iniciais devem incluir urinálise, teste de gravidez, Papanicolau vaginal e endocervical (Jackson e Telner, 2006).

A avaliação pré-operatória com técnicas de imagem pode facilitar a excisão cirúrgica total. Na ultra-sonografia 2-D (duas dimensões), as lesões de endometriose da cicatriz podem aparecer como massas císticas ou multicística, mistas ou sólidas, com vascularização interna em poder Doppler. A ultra-sonografia 2-D permite a avaliação pré-operatória da extensão de tais lesões. Se a ultra – som em 2D e Doppler parecer insuficiente, na medida e no comportamento biológico, pode ser melhor avaliadas por ressonância magnética. Imagem por ressonância magnética T1 ponderada mostra lesões com uma radiodensidade (quantidade de radiação absorvida por cada parte do corpo analisada) semelhante ao músculo, enquanto T2 ponderado mostra alta intensidade de sinal com realce marcado. Assim, a ressecção operatória pode ser planejada com precisão e segurança, particularmente em lesões extensas e recorrentes que se infiltram nas camadas mais profundas da parede abdominal (Pados et al, 2008).

No entanto, é importante compreender que ultra-som geralmente só demonstram lesões de endometriose, que formam cistos ou endometriomas nos ovários. Lesões

peritoneais não podem ser demonstradas e, na maioria dos casos, nem nódulos pélvicos profundo do septo reto-vaginal podem, sem técnicas especializadas (Fraser, 2008).

A intra-sonografia pélvica pode ser útil para o diagnóstico, especialmente se um endometrioma é identificado. Ela também pode ajudar a excluir outras causas de dor pélvica, como miomas e cistos ovarianos. Ultra - sonografia transvaginal é melhor para visualizar a cavidade uterina e do endométrio, mas verificação trans-abdominal são preferidas quando grandes massas pélvicas são suspeitas. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética são, por vezes, útil, especialmente para a caracterização de massas pélvicas, mas não devem ser ordenados de forma rotineira (Jackson e Telner, 2006).

Certamente a avaliação diagnóstica da paciente com suspeita de endometriose inclui a laparoscopia, que é o padrão - ouro no diagnóstico de endometriose (Passos et al, 2000). Sendo assim a laparoscopia é o teste mais definitivo para diagnosticar a endometriose através da visualização de biópsia de lesões típicas, mas não é sempre necessária. A dor nem sempre se correlaciona com a gravidade diagnosticada com a laparoscopia. De todas as biópsias de lesões observadas, apenas 45% estão confirmados para a endometriose. Resultados negativos de diagnósticos por laparoscopia são precisos para excluir a endometriose (Jackson e Telner, 2006).

Os progressos realizados nos últimos anos com laparoscopia operatória mostram que o tratamento da endometriose profunda pode ser encarado com a cirurgia laparoscópica. Várias equipes têm relatado sua experiência no tratamento cirúrgico por laparoscopia de endometriose profunda, localizada no septo reto-vaginal. A cirurgia oferece a única forma de se ter um diagnóstico histológico e eliminar todas as lesões. Os progressos registrados ao longo dos últimos anos permitem que as pacientes que apresentam sintomas dolorosos em um contexto de endometriose, a serem tratadas com sucesso pela cirurgia laparoscópica. Os resultados são satisfatórios e aproximadamente duas de cada três mulheres tratadas por laparoscopia para endometriose vão notar uma melhora na dor pélvica, que vai durar por pelo menos 1 ano (Chapron e Dubuisson, 1996).

#### **1.1.16- Tratamento**

A endometriose é uma doença crônica e hormônio - dependentes do útero, com um curso clínico altamente variável. Assim, o tratamento deve ser projetado de acordo com as necessidades individuais da paciente. Isso não significa que ele deve ser escolhido de

forma arbitrária. O médico deve discutir com a paciente, se a razão principal para o tratamento é a dor aguda ou crônica relacionada com endometriose ou um desejo, ainda não satisfeito de ter filhos (Halis et al, 2010).

Endometriose não precisa ser tratada, a menos que seja sintomática. Tratamento médico e cirúrgico, foram encontrados igualmente eficazes, exceto para o tratamento da infertilidade. Se uma mulher não está tentando engravidar e não tem nenhuma evidência de uma massa pélvica ao exame, o tratamento médico sem confirmação empírica laparoscópica pode ser julgado com base na suspeita clínica. Se a gravidez é desejada, o tratamento cirúrgico é necessário, como nenhum método farmacológico tem sido indicado para restabelecer ou manter a fertilidade (Jackson e Telner, 2006).

A maioria dos tratamentos, visam reduzir os sintomas da endometriose, mas nenhum foi mostrado para impedir completamente a recorrência dos sintomas após o tratamento ser interrompido. Os sintomas retornam em 37% das vezes como doença leve e 74% das vezes como doença severa. A resposta hormonal é utilizada como base dos tratamentos médicos, mas como nenhum tratamento médico demonstrou superioridade sobre o outro, a escolha do tratamento é baseado no perfil de efeitos colaterais, custo e preferência pessoal. A maioria dos medicamentos, melhoram os sintomas em 80% a 90% das pacientes (Jackson e Telner, 2006).

A terapia médica envolve: a ingestão de analgésicos, seguido por supressão hormonal. A supressão altamente efetiva é fornecida por análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), especialmente os implantes goserelin (Zoladex), dado ao longo de seis meses, mas danazol (Azol), prevê uma supressão muito semelhante. Os efeitos secundários destes dois medicamentos são bem conhecidos e incluem sintomas vasomotores para os análogos de GnRH e discretas alterações androgênicas para danazol e precisa ser tratada com orientação e acompanhamento regular (Fraser, 2008).

Opções de primeira linha são os antiinflamatórios não - esteroidais e baixas doses de contraceptivos orais combinados. Se as pacientes não respondem ou respondem inadequadamente após três meses, os tratamentos de segunda linha, que incluem progestinas (oral, injetável e intra-uterina), os andrógenos, e análogos do agonista GnRH devem ser julgados. Estes são todos igualmente eficazes na redução da dor moderada e severa da endometriose. Alguns destes medicamentos podem ser usados apenas a curto prazo, mas seu uso pode permitir que a doença seja controlada, na medida em que outros medicamentos podem ser usados para a manutenção (Jackson e Telner, 2006).

As células da endometriose expressam receptores de estrogênio (ER  $\alpha/\beta$ ) e progesterona (PR A/B) e, portanto, respondem aos tratamentos endócrinos (Halis et al, 2010). Os progestogênios oferecem os níveis mais eficazes de repressão, embora nem todas as pacientes respondam bem. Às vezes, as doses precisam ser individualizadas. A pílula anticoncepcional oral pode funcionar de forma satisfatória como uma abordagem inicial ao tratamento médico, mas somente à uma minoria faz bem. Existe uma mudança gradual para usar os anticoncepcionais intra-uterino (Mirena) e subcutâneo (Depo-Provera, Depo-Ralovera, Implante Implanon) como sistemas de fornecimento de progestogênios, por sua conveniência e eficácia. Casos difíceis podem fazer ainda melhor com uma combinação destes dois sistemas de distribuição, mas esta terapia é especializada para as mulheres que não respondem a outras terapias (Fraser, 2008).

Os contraceptivos orais combinados a terapia apenas com progesterona e análogos de GnRH têm sido usados na abordagem terapêutica da endometriose cutânea, mas a recorrência é comum após a descontinuação do tratamento. Por outro lado, a excisão profunda de toda a lesão, mesmo se isso implicar a excisão do tecido fibroso que envolve os órgãos, leva à cura definitiva. As reincidências são raras após o tratamento cirúrgico, e é geralmente atribuída a excisão inadequada (Pados et al, 2008).

Os tratamentos cirúrgicos são geralmente reservados para as mulheres que desejam engravidar e mulheres cujos sintomas não respondem à terapia médica. As opções cirúrgicas incluem a excisão ou ablação de implantes endometriais (endocoagulação, electrocauterização ou tratamento com laser) e tem 50% a 80% de taxa de sucesso na redução dos sintomas. Nenhuma técnica cirúrgica revelou superioridade à outra. Infelizmente, 25% das biópsias de tecido normal, deveriam revelar a endometriose, por isso nem todas as lesões podem ser vistos e tratados (Jackson e Telne, 2006).

A cirurgia laparoscópica é útil para o controle da dor na doença leve a moderada e foi mostrado produzir uma taxa de gravidez de 65% após dois anos em pacientes com infertilidade associada à endometriose. A cirurgia definitiva, que inclui a histerectomia (operação cirúrgica para retirado do útero) e ooforectomia (remoção cirúrgica de um ou ambos ovários), é reservada para a dor intratável ou efeitos colaterais intoleráveis de terapia médica. Ooforectomia reduz as taxas de recorrência de 62% para 10% e diminui as taxas de repetir a operação de 31% para 4%. Com ooforectomia bilateral, é necessário adicionar novamente a terapia com estrógeno até que o paciente chegue a uma idade mais próxima da menopausa. As mulheres devem ser informadas de que a endometriose pode ter

recorrência em 5% a 15% dos casos, mesmo após a histerectomia e ooforectomia bilateral (Jackson e Telner, 2006).

A avaliação completa da infertilidade deve ser concluída antes de considerar o tratamento da endometriose. Para as mulheres inférteis com suspeita de endometriose mínima ou leve, a decisão de se fazer a laparoscopia deve ser tomada antes de iniciar os tratamentos para aumentar a fertilidade. É evidente que a dor, fatores como a idade de uma mulher e a duração da infertilidade devem ser considerados. Outros fatores de infertilidade podem coexistir e colidir com as taxas de sucesso e resultado do tratamento. Se a dor também é uma preocupação, o tratamento cirúrgico com laparoscopia parece prudente. Além disso, laparoscopia e possivelmente laparotomia, são recomendadas quando a endometriose suspeitada é moderada ou grave, se nenhuma outra causa para a infertilidade foi encontrada (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, 2007).

#### **1.1.17- Endometriose e Infertilidade**

Existe um grande corpo da evidência que demonstra uma associação entre a endometriose e a infertilidade. A endometriose pode ser encontrada em até 50% das mulheres inférteis. Pacientes inférteis com endometriose leve não tratada concebem a sua própria prole, a uma taxa de 2% para 4,5% ao mês, em comparação com a taxa mensal de 15% para 20% de fertilidade nos casais normais. Pacientes inférteis com endometriose moderada e grave apresentam taxas de gestação mensal inferior a 2%. Mesmo a endometriose estando fortemente associado com a infertilidade, nem todas as mulheres que têm endometriose são inférteis (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, 2007).

As pacientes com endometriose têm cerca de 20 vezes mais chance de serem inférteis do que mulheres que não tenham endometriose (Passos et al, 2000). A relação entre causa e efeito da endometriose e a fertilidade reduzida é presumida, mas não provada. Não se sabe como a endometriose mínima e leve reduz a fertilidade quando não há aderências. Presume-se que a endometriose pélvica altera o ambiente de maneira sutil, mas importante. As teorias incluem inflamação, alteração do sistema imunológico, alterações hormonais, a função anormal da tuba uterina, fertilização ou implantação danificada. É mais fácil compreender como a endometriose moderada e severa reduz a fertilidade, uma vez que grandes aderências pélvicas, quando presentes, podem impedir a liberação dos óvulos, a entrada do espermatozoide na trompa de Falópio, impedindo a capacidade da trompa de

Falópio para pegar os óvulos durante a ovulação (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, 2007).

Múltiplos fatores têm sido implicados na associação da endometriose e a infertilidade, incluindo a distorção da anatomia pélvica, anormalidades da secreção e ação de hormônios, alterações no líquido peritoneal, distúrbios da fecundação e funções imunomoduladoras. Exame eutópico do endométrio das mulheres com endometriose revelou defeitos, incluindo dessincronização do fenótipo angiogênico e anomalias ultra-estrutural. Sendo proposto que o ambiente inflamatório peritoneal criado pela presença de lesões de endometriose induz a um ambiente uterino imunológico que não é propício para o estabelecimento da gravidez (Hastings e Fazleabas, 2006).

Acredita-se que citocinas são moléculas reguladoras muito importantes não só para o sistema imunológico, mas para muitas outras funções importantes de um organismo. É conhecido que o processo reprodutivo é diretamente ligado à regulação de citocinas. Após a fecundação, apesar de o embrião produzir citocinas próprias para apoiar seu crescimento, ele é muito dependente do endométrio materno para a implantação. Considerando-se as citocinas durante a patologia da endometriose e a exigência de citocinas para a ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário precoce, não é difícil prever como a endometriose se correlaciona com infertilidade. As citocinas são as principais responsáveis para impedir a concepção (Vassiliadis et al, 2005).

#### **1.1.18- Câncer ovariano e endometriose**

Diversos fatores etiológicos têm sido implicados nos tipos de câncer de ovário, embora, no presente, pouco se sabe sobre os eventos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento individual. Alguns tipos, tais como células endometriais claras, foram mostradas associada à doença benigna, endometriose. Embora muitos dos fatores de risco associados com as duas doenças sejam semelhantes, incluindo que menstruaram mais cedo, mais períodos irregulares, a duração do ciclo mais curto e menor a paridade, endometriose em si pode ser um fator de risco para câncer de ovário. No entanto, os resultados de estudos observacionais da associação entre estas duas doenças são inconsistentes. Alguns estudos mostraram um risco aumentado para câncer de ovário, enquanto outros estudos não confirmaram essa associação (Aris, 2010).

Aris (2010) mostrou que um grupo de mulheres com endometriose, tiveram um risco aumentado de câncer de ovário de 1,6%. Por outro lado, a idade no momento do diagnóstico de câncer de ovário, no estudo, é de cerca de 54 anos. Sendo interessante notar que a idade média ao diagnóstico de câncer de ovário em pacientes com endometriose é de 48 anos, portanto anterior cerca de 5,5 anos médios. Essa diferença na idade ao diagnóstico pode ser explicada, pelo fato de que as mulheres com endometriose tenham feito consultas anteriores devido aos sintomas associados. No entanto, a hipótese de um desenvolvimento do câncer ovariano anterior em mulheres com endometriose não pode ser descartada. A manifestação anterior do câncer ovariano tem consequências graves, já que a sobrevivência em casos de câncer de ovário raramente ultrapassa 5 anos.

Em aproximadamente 60% das associações de endometriose e câncer de ovário, o câncer está ao lado, ou surge diretamente, no tecido da endometriose, sugerindo que ocorre transformação maligna. Embora a endometriose é uma "doença" benigna, tem muitas características de neoplasia. Esta patologia pode mostrar um crescimento desenfreado e aumento da vascularização, e até mesmo características classicamente de doenças malignas associada, tais como invasão de tecidos e metástase (Prowse et al, 2006).

Evidências histopatológicas e epidemiológicas, demonstram a forte associação entre a endometriose e o câncer de ovário. Existem duas hipóteses que poderiam explicar a relação: (i) Os implantes de endometriose podem sofrer uma transformação maligna diretamente, talvez por uma fase de transição atípica de endometriose, e (ii) tanto endometriose como câncer têm partes de mecanismos antecedente comum e/ou fatores predisponentes (por exemplo, a susceptibilidade genética, desregulação imune/angiogênico, exposição a toxinas ambientais), com divergência evidente em vias moleculares descendente. Provas para apoiar estas hipóteses inclui: o aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de células claras do ovário, câncer endometrial na presença da endometriose, e semelhanças moleculares entre endometriose e câncer. Cerca de 60-80% dos casos de endometriose, ocorrem associado a câncer de ovário, na presença de endometriose de ovário atípico. Outra característica é que assim como o câncer uterino e de mama, a endometriose se comporta como uma neoplasia estrogênio-dependente (Varma et al, 2004).

No entanto, apesar da evidência histológica e epidemiológicas, que ligam estas duas doenças, ainda não está claro se a endometriose é um precursor para o câncer ovariano ou se existe uma relação indireta envolvendo fatores ambientais comum, imunológicos,

hormonais ou genéticas. Estudos de genética molecular, de perda de alelos tem sido utilizado para demonstrar a progressão clonal da lesão precursora do câncer (Prowse et al, 2006).

### **1.1.19- Componentes ambientais**

Até uma década atrás, os obstetras não eram muito conscientes do impacto do ambiente sobre a saúde reprodutiva. Eles estavam muito absorvidos na gestão dos problemas de infertilidade, abortos, hemorragias obstétricas, bebês de baixo peso ao nascer e bebês malformados, numa base individual. Eles não percebiam que alguns dos problemas obstétricos e ginecológicos que estavam lidando, eram resultado de influências ambientais (Bhatt, 2000).

A susceptibilidade de um indivíduo não é somente influenciada pelos fatores genéticos, mas também pela interação de genes com fatores ambientais. A dioxina e seus compostos como os bifenilos policlorados (PBC) tem sido, relacionados como fatores envolvidos no desenvolvimento da endometriose. Estes compostos são hidrofóbicos e resistentes a degradação do metabolismo, com uma vida-média estimada de sete anos em humanos. Conseqüentemente, eles se acumulam em alta concentração nos lipídeos das membranas, e são liberados lentamente no sangue. Além dos efeitos tóxicos, a dioxina tem efeitos adversos sobre o sistema reprodutor feminino (Bischoff e Simpson, 2000).

Tem sido demonstrado que várias substâncias químicas presentes na poluição ambiental têm a capacidade de agir como hormônios. Quando esses "hormônios ambientais" são tomados no corpo através da poluição do ar, elas podem imitar os efeitos dos hormônios naturais do corpo e interromper uma série de processos biológicos importantes. Os poluentes ambientais que podem imitar o hormônio estrogênio incluem o DDT (ditiotretol), DDE (diclorodifenildicloroetileno), Kepone (inseticida sintético clordecona), heptacloro (composto organoclorado que é usado como inseticida), PBCs, dioxinas e produtos de degradação dos detergentes. Muitos destes compostos podem ser transportados por longas distâncias através da poluição do ar e, em seguida, depositados no solo e na água e, eventualmente, na cadeia alimentar (Bhatt, 2000).

Mais recentemente, após a descoberta de uma relação dose-dependente entre dioxinas e a gravidade da endometriose, a exposição a substâncias ambientais químicas hormonalmente ativo tem sido estudada como um fator de risco para a endometriose, de

acordo com a natureza presumida estrogênio-dependente da doença. Os PBCs e dioxinas têm sido associados com o risco de endometriose confirmada entre as mulheres submetidas à laparoscopia, especialmente os congêneres do PBC com propriedades anti-estrogênicas (Hediger et al, 2005).

Apesar das dioxinas do ambiente não serem um estrogênio, é um dos químicos mais tóxicos no ambiente, e é capaz de bloquear a ação do estrógeno, diminuindo os níveis de androgênios (hormônios masculinos) e afetando a quantidade de hormônios tireoidianos produzidos. Também pode afetar os níveis de insulina e a quantidade de glucocorticóide secretado pelas glândulas supra-renais. Também tem sido implicado como uma causa para a endometriose (Bhatt, 2000).

### **1.1.20- Xenobióticos**

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos naturais e/ou não naturais, a eles estranhos. Estes compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira deletéria ao organismo (Huber e Almeida, 2008). A exposição diária à xenobióticos pode causar a absorção destes, através dos pulmões, da pele ou ingeridos, não intencionalmente, como contaminantes nos alimentos e na água ou, deliberadamente, na forma de medicamentos com fins terapêuticos ou não. Os xenobióticos podem levar o organismo a produzir respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica, sendo que essas respostas dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (Cataneo et al, 2003).

Como a produção de alimentos se dá por meio da prática da agricultura e da pecuária, e o rendimento desta produção enfrenta a concorrência de outros sistemas biológicos: vegetais, animais, microbianos ou parasitários. Desta forma, o processo de modernização da agricultura, nos anos 60, introduziu o emprego de novas variedades mais produtivas e dependentes de adubos químicos, uso intensivo de herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas, parasiticidas, inseticidas, enfim pesticidas e máquinas agrícolas a fim de se aumentar os índices de produtividade. O emprego destes agentes químicos resultou em aumento da produtividade, mas por outro lado trouxe conseqüências adversas ao homem, visto serem estes agentes nocivos ao homem e ao ambiente. O emprego indiscriminado de pesticidas na agricultura, sem as devidas precauções e cuidados em relação à manipulação, produção, estocagem e destino final, põe em risco não só o meio

ambiente, mas também a saúde das pessoas que de alguma forma entram em contato com tais produtos (Ueta et al, 1999).

Os trabalhadores agrícolas são muito expostos aos xenobióticos. Ao utilizar produtos sintéticos, como os pesticidas, o homem tem contaminado tanto o meio abiótico como o biótico, em decorrência da fácil dispersão desses produtos e de sua longa permanência no meio ambiente. Sendo assim, a extrema persistência de alguns praguicidas transforma-os em contaminantes, encontrados em ambientes terrestres e aquáticos, por muitos anos (Bulcão et al, 2008).

O organismo desenvolveu um conjunto de estratégias como: sequestro, limpeza e biotransformação catalítica que evoluíram como um importante mecanismo de proteção bioquímica contra espécies bioquímicas tóxicas. As células possuem um impressionante conjunto de enzimas capazes de biotransformar uma grande variedade de substâncias químicas com diferentes estruturas e funcionalidade. Enzimas de detoxificação de xenobióticos, tem sido classificadas em três fases distintas, as quais atuam de forma integrada. Fase I e II envolvem a conversão de um xenobiótico lipofílico não polar em um mais solúvel em água, logo, metabólitos menos tóxicos, que pode então ser eliminados com mais facilidade pela célula (Sheehan et al, 2001).

A fase I do sistema de detoxificação envolve compostos principalmente da família de enzimas do citocromo P450, geralmente é a primeira defesa contra compostos enzimáticos estranhos ao organismo. A maior parte dos fármacos são metabolizados através da fase I da biotransformação. Uma reação típica desta fase é quando uma enzima do citocromo P450 (CYP450) usa o oxigênio, e como co – fator o NADH, para adicionar um grupo reativo, tal como um radical hidroxila. Como consequência desta etapa de desintoxificação, são produzidas moléculas reativas, podendo ser mais tóxicas que a molécula-mãe. Se estas moléculas não forem metabolizadas pela conjugação que ocorre na fase II, podem causar danos às proteínas, RNA e DNA dentro da célula. Sendo que nesta fase ainda inclui reações de redução ou de hidrólise, podendo as drogas serem ativadas, inativadas ou terem inalteradas suas atividades. Na fase I também estão envolvidas desintoxificação de moléculas endógenas, como esteróides (Losi-Guembarovski e Cólus, 2001; Sheehan et al, 2001; Huber e Almeida, 2008).

A fase II do sistema de desintoxificação envolve reações de conjugação, normalmente seguem a fase I de ativação. Catalisam a conjugação dos xenobióticos ativados para um substrato endógeno solúvel em água, como a glutatona reduzida (GSH),

o ácido UDP – glucurônico ou a glicina, ou seja, estas enzimas participam de um conjunto de reações que adicionam conjugados hidrofílicos para o metabolito. A conjugação com o GSH, que é catalisada pela glutathione S-transferase é a mais frequente. Na fase III, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. Juntas a fase I, II e III do sistema de desintoxicação controlam a quantidade de xenobióticos e seus metabólitos que podem se acumular nas células, limitando assim sua toxicidade (Losi-Guembarovski e Cólus, 2001; Sheehan et al, 2001; Huber e Almeida, 2008; Zhang et al, 2009).

A glutathione S-transferase (GST) desempenha um papel importante na resposta do estresse causado por herbicidas nas plantas; é considerada uma enzima de desintoxicação, por metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos, por meio da conjugação destes com glutathione reduzida, formando substâncias de baixa toxicidade (Cataneo et al, 2003).

Vários genes e proteínas estão relacionados com metabolização/detoxificação de xenobióticos, que são usualmente utilizados em estudos de marcadores potenciais de suscetibilidade para desenvolvimento de várias doenças, inclusive câncer, nas quais a etiologia está relacionada à exposição ambiental. Genes que codificam as enzimas de ativação (reação de fase I) ou detoxificação (reação de fase II) de xenobióticos são alvos potenciais para estudos de suscetibilidade genética. Muitos estudos mostram que a detoxificação celular feita por enzimas está relacionada com a proteção celular. A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças, como o câncer (Miller et al, 1997, Wilkinson e Clapper 1997).

O estresse oxidativo (SO) tem sido proposto como um fator potencial envolvido na fisiopatologia da endometriose. Vários estudos indicam que as defesas antioxidantes podem ser alteradas na endometriose, como sugerido pela expressão aberrante de enzimas antioxidantes endometrial e os níveis mais baixos da vitamina E antioxidante no líquido peritoneal. Espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso podem provocar danos oxidativos no DNA como: quebras no DNA, modificações de base e aberrações cromossômicas (Attar et al, 2010).

A produção de espécies reativas de oxigênio pelo fluido peritoneal parece estar aumentada em mulheres com endometriose, 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 ROS pode também ser resultado da exposição a compostos ambientais que rompem o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (Nakata et al, 2004).

Em um corpo saudável, as ROS e antioxidantes permanecem em equilíbrio, quando este equilíbrio é interrompido para uma superabundância de ROS, o estresse oxidativo ocorre. O SO influencia toda a vida reprodutiva da mulher e mesmo depois (ou seja, a menopausa). O SO resulta de um desequilíbrio entre pró-oxidantes (espécies de radicais livres) e a capacidade de limpeza do corpo (antioxidantes). ROS são como uma faca de dois gumes, moléculas que servem como sinal chave em processos fisiológicos, mas também apresentam um papel em processos patológicos envolvendo o trato reprodutivo feminino. ROS afetam vários processos fisiológicos de maturação de oócitos para a fecundação, desenvolvimento embrionário e gravidez. Tem sido sugerido que o SO modula o declínio relativo à idade na fertilidade. Ela desempenha um papel durante a gravidez e o parto normal e no início do trabalho de parto prematuro (Agarwal et al, 2005).

Os três principais tipos de ROS são: superóxido ( $O_2 \bullet^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroxila ( $OH \bullet$ ) (Agarwal et al, 2005). Apesar dos fatores que afetam a perda de fertilidade e gravidez precoce, ser relativamente pouco conhecidos, existe evidências suficientes para supor que os antioxidantes da dieta e do SO podem influenciar na duração e manutenção de uma gravidez viável (Ruder et al, 2008). ROS podem afetar uma variedade de funções fisiológicas no trato reprodutivo, e em níveis excessivos podem resultar em patologias que afetam a reprodução do sexo feminino. (Agarwal et al, 2005).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* estão envolvidos no metabolismo de uma ampla variedade de xenobióticos, incluindo substâncias ambientais cancerígenas, agentes quimioterápicos, e as espécies reativas de oxigênio. Além disso, *GSTM1* parece fazer uma contribuição distinta na susceptibilidade ao câncer, porque suas especificidades por substrato pode ser diferente de outras classes de GSTs (Rebbeck, 1997).

### **1.1.21- Sistema Glutationa S-transferase (GST)**

As glutathionas transferases ou glutathiona S-transferase, compreendem uma família de enzimas multifatoriais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathiona (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um hidrogênio, ou um átomo

de enxofre eletrofílico (Hayes et al, 2005). Nos mamíferos são encontradas três famílias de GST: citossólica, mitocondrial e microsomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsomal se encontram associadas à membrana (Hayes et al, 2005; Sheehan et al, 2001; Huber e Almeida, 2008). A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (exceto em células epiteliais), pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutâmico e cisteína, catalisada pela enzima  $\gamma$ - glutamilcisteína sintetase, levando à  $\gamma$ -L- glutamil-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione sintetase (Huber e Almeida, 2008).

Estas enzimas realizam uma ampla gama de funções nas células, tais como a remoção de espécies reativas de oxigênio, catálise de conjugações com substâncias endógenas e catálise de reações em vias metabólicas não associadas com desintoxicação. Elas também têm sido implicadas em uma variedade de fenômenos que envolvem agentes de resistência a quimioterapia de câncer, antibióticos microbianos, inseticidas e herbicidas (Sheehan et al, 2001).

A produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânio superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (HO), é consequência natural da respiração aeróbica. Estas espécies podem causar danos estruturais a muitas biomoléculas, como lipídeos de membrana, DNA, proteínas, carboidratos, etc (Huber e Almeida, 2008). As GSTs inativam metabólitos secundários formados durante o SO (Hayes et al, 2005). As GSTs também são responsáveis pela detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são ubíquos e provavelmente o contaminante ambiental mais temido em todo o mundo (Guo, 2005).

A capacidade de sobreviver à ameaça representada pelos compostos xenobióticos provavelmente representa uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência. Junto com estratégias como o sequestro, a limpeza vinculativa e a biotransformação catalítica, evoluíram como um importante mecanismo bioquímico de proteção contra espécies químicas tóxicas. As células possuem uma impressionante variedade de enzimas capazes de biotransformar uma grande variedade de estruturas e funcionalidades químicas diferentes, gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (Sheehan et al, 2001; Huber e Almeida, 2008).

Nos últimos anos, tem sido procurado exaustivamente o papel dos polimorfismos das GST como fator de risco para a endometriose. GST são enzimas chave da fase II, que

catalisam a conjugação de glutationa a inúmeros compostos potencialmente genotóxicos. Apesar de não ser totalmente coerente, vários estudos sugerem que há uma correlação entre a endometriose e o genótipo GSTM1 ou GSTT1 (Ertunc et al, 2005). Devido às propriedades de desintoxicação da família de enzimas GST, é plausível que a falta de função ou redução de desintoxificação de enzimas devido ao polimorfismo de deleção, podem predispor as mulheres com risco aumentado para endometriose (Guo, 2005).

As isoenzimas citosólicas são divididas em pelo menos cinco classes principais ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ), entre os quais polimorfismos foram detectados nos genes que codificam para GSTM1 e GSTM3 (classe  $\mu$ ), GSTP1 (classe  $\pi$ ), GSTT1 (classe  $\theta$ ) e GSTZ1 (classe  $\zeta$ ). Entre eles os genótipos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 têm sido amplamente estudados nos últimos anos por seu potencial papel na modulação da susceptibilidade individual a doenças induzidas pelo ambiente, como o câncer (Stucker et al, 2002).

#### 1.1.21.1- *GSTM1* e *GSTT1*

O gene *GSTM1* localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p13.3). Este gene é polimórfico, existindo dois alelos no locus do *GSTM*, sendo *GSTM-1a* e *GSTM-1b*, que diferem entre si por uma substituição em um único par de bases, C  $\rightarrow$  G na posição 534. O resultado é a substituição de Lys  $\rightarrow$  Asn no aminoácido 1724. O genótipo *GSTM-1* (*GSTM1-0*) nulo possui uma deleção no gene que codifica *GSTM-1a/b*. Os alelos podem se combinar formando genótipos heterozigotos (*GSTM-1ab*, *GSTM-1b0* e *GSTM-1a0*) e homozigotos (*GSTM-1aa*, *GSTM-1bb* ou *GSTM-100*). Em indivíduos que possuem o genótipo homozigoto nulo para *GSTM-1*, a atividade desta enzima está ausente e não há expressão nem de *GSTM-1a*, nem de *GSTM-1b*. A maioria dos estudos analisa a relação dos portadores dos genótipos *GSTM1* e *GSTM1*nulo (Fryer et al, 1993; Rebbeck, 1997; Cotton et al, 2000).

O *GSTT1* esta localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2). Existem duas isoenzimas na classe theta identificadas, *GSTT1-1* e *GSTT2-2*, sendo as duas compostas por cinco éxons com limites de íntron/exon idênticas. Apesar das duas isoenzimas serem semelhantes, elas compartilham apenas 55% de seqüência de aminoácidos idênticas (Coggan et al, 1998; Strange et al, 2000).

Como *GSTM1* e *GSTT1* apresentam deleções, que resultam em alelos nulos, que em homozigose, conferem completa perda da atividade enzimática, subentende-se que estas

enzimas parecem ser importantes na detoxificação dos produtos do estresse oxidativo, por exemplo, hidroperóxidos de lipídios, hidroperóxidos de alceno no DNA, bem como potenciais agentes cancerígenos como haletos de metila, epóxidos de benzo [a] pireno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), presentes na dieta e no fumo (Hadfield et al, 2001).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos em humanos, estes genes estão ausentes, ou homozigoto nulo, em 10-60% das diferentes populações étnicas. Estas enzimas catalisam a conjugação da glutatona a numerosas substâncias químicas cancerígenas. Estudos epidemiológicos anteriores têm associado os genótipos nulos dos genes GST com o maior risco de desenvolver câncer (Kato et al, 1996).

O estudo de Rebbeck (1997), mostra que a frequência em intervalos do genótipo homozigoto *GSTM1* nulo em caucasianos é de 0,33 à 0,67, em africanos e afro-americanos de 0,22 à 0,35. Com relação ao genótipo *GSTT1* nulo em caucasianos a frequência encontrada pode ser de aproximadamente 20% maior que a frequência em populações africanas ou asiáticas.

O *GSTM1* tem sido relatado em nível significativo em pacientes com endometriose, e pode representar um alelo de suscetibilidade de endometriose (Baxter et al, 2001). Deleções nulas no gene *GSTM1* foram ligadas a um risco aumentado de endometriose em mulheres francesas, russas, indianas, chinesas e de Taiwan. Estas deleções nulas não foram mostrados afetando a suscetibilidade de endometriose em mulheres coreanas, japonesas e australianas, embora o estudo australiano indicou que a deleção nula do *GSTM1* em lesões podem predispor à transformação endometrial maligna (Tempfer et al, 2009).

Estudos realizados na Grécia, França, Índia, Reino Unido, Japão e a Coréia não mostraram correlação entre a variante *GSTT1* nulo e a susceptibilidade à endometriose, enquanto que um estudo com mulheres russas mostrou tal associação (Tempfer et al, 2009).

Vários autores propõem que o *GSTM1* e *GSTT1* são fatores críticos na detoxificação de produtos do estresse oxidativo, produzidos durante o restabelecimento do epitélio do ovário. Estes alelos homozigotos nulos, em ambos genes, podem atuar causando ineficiência na detoxificação de produtos intermediários durante o estresse o que aumenta os danos em vários genes de células hospedeiras, incluindo *p53*, e resultando na expressão persistente de proteína mutante (Bischoff e Simpson, 2000).

## 2- Justificativa

A endometriose é uma das patologias mais encontradas na clínica ginecológica. Sua associação com dor pélvica, infertilidade, dismenorréia e dispareunia torna seu diagnóstico um fator importante para a paciente. O quadro clínico da endometriose é bastante variável. Ela é considerada uma “doença dos contrastes” clínicos (doença benigna com quadro clínico que pode ser devastador). Cerca de 30 a 40% dos casos são assintomáticos (Passos et al, 2000).

A endometriose tem um atraso médio no diagnóstico entre 8 e 12 anos, devido as limitações da investigação diagnóstica. Devido à dificuldade nos consultórios na atenção primária em se fazer uma avaliação da sintomatologia, a endometriose só é diagnosticada em consultas de atenção secundária através da laparoscopia. Enquanto a laparoscopia é considerada o padrão ouro para diagnosticar a endometriose, é importante notar que até esta investigação acarreta um risco de falso-negativo. Daí a importância em se concentrar pesquisas no desenvolvimento de diagnóstico não – cirúrgico, que pode ser facilmente utilizado no prognóstico da doença (Pugsley e Ballard, 2007).

Definir os caminhos para a doença é um dos principais objetivos da pesquisa em endometriose. Esse conhecimento pode ser usado para desenvolver métodos mais eficazes de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Os estudos genéticos fornecem uma abordagem importante para definir caminhos causais influenciando a endometriose. O número de estudos de mapeamento de genes para essa doença tem aumentado nos últimos anos, visto que, o papel dos fatores genéticos tem sido amplamente aceitos. Além disso, tem havido avanços dramáticos na genética humana nos últimos anos, com muitos trabalhos recentes relatando variantes genéticas associadas com outras doenças complexas (Montgomery et al, 2008).

A endometriose tem sido relacionada, como já relatado anteriormente, com alterações genéticas. O polimorfismo *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo foram correlacionados com a endometriose e com o grau de severidade da doença (Nakata, 2004; Carvalho, 2004; Hsieh e Lin, 2006).

Este estudo comparou dois grupos de pacientes portadoras de endometriose (férteis e inférteis) com o grupo controle (composto por mulheres que não relataram nenhuma queixa relacionada a endometriose), quanto à frequência dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo, para investigar se há diferença significativa entre os grupos analisados. E

analisar a associação entre os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *p53* Arg/Pro como fator de risco na endometriose.

### **3- Objetivos**

#### **3.1- Objetivo geral**

Correlacionar a influência de polimorfismos de presença/ausência dos genes *GSTM1* (*Mu*) e *GSTT1* (*Teta*) com a ocorrência da endometriose, buscando definir se estes polimorfismos constituem fator de risco nesta patologia.

#### **3.2- Objetivos específicos**

- Analisar a frequência dos genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* no grupo de mulheres com endometriose e sem clínica de endometriose.
- Investigar a frequência dos genótipos de risco para *GSTM1* e *GSTT1* quanto a etnia, tabagismo, etilismo, uso de contraceptivos orais e atividade física na população (caso e controle).
- Analisar a associação entre o polimorfismo de presença/ausência *GSTM1*, *GSTT1* e *p53* Arg/Pro.

## **4- Materiais e métodos**

### **4.1- Casuística**

O grupo de estudo foi composto por 50 amostras de sangue periférico de pacientes com endometriose submetidas à videolaparoscopia na Clínica Fértil Diagnósticos em Goiânia - GO, quando foram observadas lesões típicas e que foram biopsiadas para exame histopatológico. Essas pacientes foram divididas em dois grupos de 26 e 24 pacientes cada, sendo que no primeiro estão as com queixa de infertilidade e com intenção de gravidez e no segundo grupo pacientes sem queixa de infertilidade, mas que apresentam outras queixas ou exame ecográfico que sugerisse endometriose.

Foram coletado sangue periférico de 46 mulheres acima de 27 anos, com pelo menos um filho e sem nenhuma queixa relacionada à endometriose, para o grupo controle.

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e todas as pacientes incluídas na pesquisa responderam um questionário sobre hábitos sociais (anexo I) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II e III).

### **4.2- Extração do DNA genômico**

A extração do DNA genômico de sangue periférico foi obtido por meio do kit Wizard® (Genomic DNA Purification Kit), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Amersham Biosciences, USA). O DNA foi mantido à temperatura de -20°C até a amplificação por PCR.

### **4.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR, visando à detecção dos polimorfismos presença/ausência dos genes *GSTT1* e *GSTM1* (tabela I).

As amplificações para a detecção do polimorfismo de presença/ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram realizadas em volume de 25 µL, os protocolos de amplificação estão resumidos nas tabelas II e IV, e as condições de ciclagem estão resumidas nas tabelas III e V.

**Tabela I:** Sequência nucleotídica dos primers *GSTT1*, *GSTM1* e *ZFX/Y*.

<i>GSTT1</i>	F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' R: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	480pb
<i>GSTM1</i>	F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb
<i>ZFX/Y</i>	F: 5'ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC 3' R: 5' GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT 3'	495pb

Abdel-Rahma et al, 1996; Simoni et al, 2004

**Tabela II:** Protocolo para a amplificação do polimorfismo *GSTM1*.

Reagentes	[ ] Reagentes	Vol. p/ 1 Amostra
Tampão	1X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 mM	1,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer Fw	20 pM	1,0 µL
Primer Rev	20 pM	1,0 µL
H <sub>2</sub> O Mili Q qsp 25µL	---	15,2 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2 µL
Volume final		25 µL

**Tabela III:** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers *GSTM1*.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°C	5	1
Amplificação cíclica	94°C	1	35
	57°C	90 seg	
	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C		

Todas as reações foram realizadas em duplicatas, e como controle interno de DNA humano utilizado o gene *ZFX/Y*. O produto obtido de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, em um campo elétrico de 10 V/cm corado com brometo de etídio (5µg/mL) e o registro visual do gel feito com o auxílio do VDS.

**Tabela IV:** Protocolo para a amplificação do polimorfismo *GSTT1*.

Reagentes	[ ] Reagentes	Vol. p/ 1 Amostra
Tampão	1X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 mM	1,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer Fw	20 pM	1,0 µL
Primer Rev	20 pM	1,0 µL
H <sub>2</sub> O Mili Q qsp 25µL	---	15,2 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2 µL
Volume final		25 µL

**Tabela V:** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers *GSTT1*.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°C	5	1
Amplificação cíclica	94°C	1	35
	57°C	90 seg	
	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C		

O polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* estudado nos dá a presença, quando esses genes são visualizados como banda na eletroforese e quando não houver amplificação se refere a ausência destes genes. Desta forma cada paciente, ao analisarmos os dois genes, pode ser considerada segundo o polimorfismo destes genes *GSTM1/GSTT1* com presença ou ausência.

O DNA genômico das 37 pacientes com endometriose e 40 do grupo controle extraído, também foram submetidas à amplificação visando à detecção do polimorfismo no códon 72 (Arg/Pro) do gene *p53* por PCR, feitas em duplicata e como controle interno o gene *ZFX/Y*. O produto obtido de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, em um campo elétrico de 10 V/cm corado com brometo de etídio (5µg/mL)

e a visualização do gel foi feita com o auxílio do sistema de vídeo-documentação (*Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA*).

Para detectar o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* foram utilizadas as seguintes sequências de primers: Pro-72 (F-5'-GCCAGAGGCTGCTCCCC-3' e R-5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3') com 177pb para prolina e Arg-72 (F-5'-TCCCCCTTGCCGTCCCAA e R-5'-CTGGTGCAGGGGCCACGC) com 141pb para arginina (Ribeiro Júnior, 2009).

Quando se tem a amplificação do polimorfismo no códon 72 do gene *p53* é possível encontrar dois produtos de PCR diferentes, um produto com 141 pb representando a presença de arginina (Arg), e outro com 177 pb que resulta na presença de prolina (Pro). Podendo a paciente ser considerada homozigota para arginina (Arg/Arg) ou para prolina (Pro/Pro) e heterozigota, contendo um alelo de cada tipo (Arg/Pro) (Figura 01).

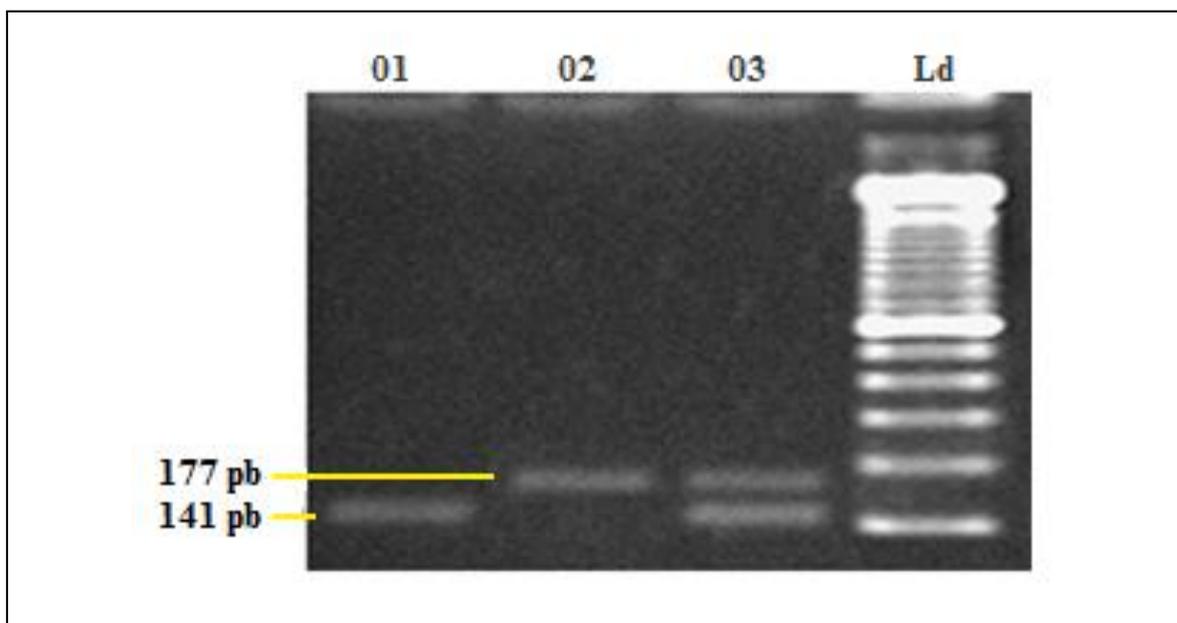


Figura 01: Gel de agarose 2% mostrando amplificações para o polimorfismo no códon 72 do gene *p53*. Nas colunas de 1 a 3 estão amostras de pacientes que amplificaram a região do polimorfismo no códon 72 do gene *p53*. A paciente 1 é homozigoto Arg/Arg (141pb), paciente 2 homozigoto Pro/Pro (177 pb) e a paciente 3 é heterozigoto Arg/Pro (177 e 141 pb). O padrão de peso molecular (Ld) utilizado nesta análise foi de 100pb (Ribeiro Júnior, 2009).

Nas tabelas VI e VII temos os protocolos utilizados para amplificação do polimorfismo no códon 72 do *p53*.

As condições de ciclagem para amplificação dos primers *p53*-Pro foram às seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1

min, anelamento a 57°C por 1 min, polimerização a 72°C por 1 min até extensão final a 72°C por 7 min.

**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 <sub>2</sub> (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 Fw	0,02 mM	0,5 µL
Primer Rw	0,02 mM	0,5 µL
H <sub>2</sub> O Mili Q qsp 25 µL	---	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 <sub>2</sub> (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 <sub>2</sub> O Mili Q	---	15,8 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

O protocolo de termociclagem para amplificação dos primers *p53-Arg* foram às seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 59°C por 1 min, polimerização a 70°C por 1 min até extensão final a 70°C por 7 min.

#### 4.4- Análise estatística

O teste Mann-Whitney foi utilizado para a comparação das idades entre o grupo endometriose e controle. Foi utilizado o teste qui - quadrado ( $\chi^2$ ) para comparar as

freqüências genóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos endometriose (infértil e fértil) e controle. O teste de Fisher para calcular a probabilidade de associação das características sociais analisadas. Considerando resultado com poder estatístico menor que 0,05. O teste de *odds ratio* para analisar se existe ou não associação entre os grupos endometriose e controle. Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do *software* Bioestat versão 5.0.

## 5. Resultados

A idade média encontrada nas pacientes com endometriose foi 33,32 anos e o desvio padrão (DP) 2,93, as pacientes do grupo controle apresentaram idade média de 37,40 anos, e o DP 11,03. Sendo a diferença estatisticamente significativa entre o grupo endometriose e o controle ( $p=0,0238$ ) (tabela VIII).

**Tabela VIII:** Comparação das variáveis das médias idades das pacientes com endometriose e controle (sem endometriose).

	N	Idade Média	DP	P <sup>a</sup>
Endometriose	50	33,32	2,93	0,02
Controle	46	37,40	11,03	

P<sup>a</sup> valor do teste Mann Whitney,  $P \leq 0,05$ .

Foram analisadas as frequências genotípicas do gene *GSTM1* e *GSTT1* no grupo de mulheres com endometriose e no grupo controle (tabela XIX). No grupo de mulheres com endometriose ( $n=50$ ) foi constatado 50% (25/50) com presença do gene *GSTM1* e 50% (25/50) com ausência do *GSTM1*. Já no grupo controle ( $n=46$ ), foi detectado 26% (12/46) de presença do gene *GSTM1* e 74% (34/46) de ausência. Houve a constatação que a frequência do gene *GSTM1* foi aproximadamente o dobro no grupo endometriose (50%) comparado com o grupo controle (26%), sendo esta diferença estatisticamente significativa,  $p=0,02$ .

**Tabela XIX:** Distribuição dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* da glutathione S-transferase nos grupos endometriose e controle.

Variáveis	Endometriose		Controle		OR	Min	Max	P
	%	N	%	N				
<i>GSTM1</i>	50	25	26	12				
<i>GSTM1</i> nulo	50	25	74	34	2,83	1,20	6,70	0,02
Total	100	50	100	46				
<i>GSTT1</i>	68	34	41	19				
<i>GSTT1</i> nulo	32	16	59	27	3,02	1,30	6,70	0,01
Total	100	50	100	46				

<sup>a</sup> P valor do teste Odds Ratio

Em relação ao polimorfismo do gene *GSTT1* observou-se as frequências genotípicas positivas em 68% (34/50) no grupo caso e 41% (19/46) no grupo controle. Para avaliação do genótipo nulo observamos 32% (16/50) e 59% (19/46) para o grupo caso e controle respectivamente. Houve a constatação que a frequência do gene *GSTT1* nulo foi

1,84 vezes maior no grupo controle o dobro no grupo endometriose (32%) comparado com o grupo controle (59%) comparado ao grupo com endometriose (32%), sendo esta diferença estatisticamente significativa,  $p=0,02$ . (tabela XIX).

Quando analisamos a frequência genotípica dos genes *GSTM1/GSTT1* juntos no grupo de mulheres com endometriose e infértil ( $n=26$ ) e controle ( $n=46$ ), foi verificado a presença dos dois genes em 23% (6/26) do grupo endometriose e infértil, 23% (6/26) *GSTM1/GSTT1*nulo, 46% (12/26) *GSTM1*nulo/*GSTT1* e 8% (2/26) a ausência dos dois genes *GTM1*nulo/*GSTT1*nulo (tabela X).

**Tabela X:** Distribuição dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* entre os grupos endometriose infértil (endo+inf) e controle.

Variável	endo+inf		Controle		P <sup>α</sup>		
	%	N	%	N	χ <sup>2</sup>	GL	αP
<i>GSTM1/GSTT1</i>	23	6	15	7			
<i>GSTM1/GSTT1</i> nulo	23	6	11	5			
<i>GSTM1</i> nulo/ <i>GSTT1</i>	46	12	26	12	12,222	3	0,0067
<i>GSTM1</i> nulo/ <i>GSTT1</i> nulo	8	2	48	22			
Total	100	26	100	46			

<sup>α</sup> P valor do teste  $\chi^2$

No grupo controle foi detectado 15% (7/46) de presença dos dois genes, 11% (5/46) *GSTM1*presente/*GSTT1*ausente, 26% (12/46) *GSTM1*ausente/*GSTT1*presente e 48% (22/46) de ausência dos dois genes. A frequência de ausência dos dois genes foi 6 vezes maior no grupo controle (48%) comparado ao grupo endometriose (8%), sendo esta diferença estatisticamente significativa,  $p=0,0067$ .

Na tabela XI o grupo de pacientes com endometriose e fértil ( $n=24$ ) e o grupo controle ( $n=46$ ) foram avaliados segundo a presença e ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. A presença dos dois genes foi encontrada em 46% (11/24) do grupo de mulheres com endometriose e fértil, *GSTM1/GSTT1*nulo em 8% (2/24), *GSTM1*nulo/*GSTT1* em 21% (5/24) e a ausência dos dois genes em 25% (6/24). No grupo controle a presença dos dois genes teve frequência de 15% (7/46), *GSTM1/GSTT1*nulo 11% (5/46), *GSTM1*nulo/*GSTT1* 26% (12/46) e a ausência dos dois genes 48% (22/46). Foi constatado que a frequência dos genes *GSTM1/GSTT1* foi aproximadamente 3 vezes maior no grupo endometriose e fértil (46%) comparado ao grupo controle (15%), sendo esta diferença estatisticamente significativa, com  $p=0,0443$ .

**Tabela XI:** Distribuição dos genes *GSTM1* e *GSTT1* entre os grupo endometriose fértil (endo+fert) e controle.

Variável	endo+fert		Controle		$\chi^2$	GL	"P
	%	N	%	N			
<i>GSTM1/GSTT1</i>	46	11	15	7			
<i>GSTM1/GSTT1</i> nulo	8	2	11	5			
<i>GSTM1</i> nulo/ <i>GSTT1</i>	21	5	26	12	8,084	3	0,0443
<i>GSTM1</i> nulo/ <i>GSTT1</i> nulo	25	6	48	22			
Total	100	24	100	46			

<sup>a</sup> Valor de P do teste  $\chi^2$

Na tabela XII analisamos os polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* com relação à etnia, sendo que, observamos no grupo com endometriose (n= 50) 43 mulheres que se disseram brancas e 7 negras, no grupo controle (n=46) 28 se disseram brancas e 5 negras, sendo que, 9 se classificaram como pardas e 4 não responderam.

No grupo de mulheres brancas com endometriose observou-se as frequências positivas do polimorfismo *GSTM1* em 53% (23/43) e 47% (20/43) do *GSTM1* nulo. No grupo de mulheres negras com endometriose foi detectado 29% (2/7) de frequência positiva do *GSTM1* e 71% (5/7) do *GSTM1* nulo. A frequência positiva do *GSTM1* foi 1,82 vezes maior no grupo de mulheres brancas (53%) comparado ao grupo de mulheres negras (29%), contudo não foi encontrado diferença estatisticamente significante, sendo p= 0,41.

O polimorfismo *GSTT1* no grupo de mulheres brancas com endometriose foi detectado com frequência positiva em 67% (29/43) e 33% (14/43) de *GSTT1* nulo. No grupo de mulheres negras com endometriose foi detectado a frequência positiva do *GSTT1* em 71% (5/7) e 29% (2/7) de *GSTT1* nulo. A frequência de *GSTT1*nulo foi 1,13 vezes maior no grupo de mulheres brancas (33%) comparado ao grupo de mulheres negras (29%), contudo não foi encontrado diferença estatisticamente significante, sendo p=0,82.

No grupo controle foi encontrado 21% (6/28) de frequência positiva do *GSTM1* e 79% (22/28) de *GSTM1* nulo. No grupo controle composto por mulheres negras a frequência positiva do *GSTM1* foi de 20% (1/5) e 80% (4/5) de *GSTM1* nulo. A frequência positiva do *GSTM1* foi 1,05 vezes maior no grupo de mulheres brancas (21%) comparado ao grupo de mulheres negras (20%), contudo não foi encontrado diferença estatisticamente significante, sendo p= 0,6.

O polimorfismo *GSTT1* no grupo controle composto por mulheres brancas foi detectado com frequência positiva em 36% (10/28) e 64% (18/28) de *GSTT1* nulo. No grupo controle composto por mulheres negras foi detectado a frequência positiva do *GSTT1* em 40% (2/5) e 60% (3/5) de *GSTT1* nulo. A frequência positiva do *GSTT1* foi

1,11 vezes maior no grupo de mulheres negras (40%) comparado ao grupo de mulheres brancas (36%), contudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, sendo  $p=0,74$ .

**Tabela XII:** Comparação da variável etnia com os genótipos do polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos estudados, endometriose e controle.

Grupos/ Variáveis	Cor				OR	Min	Max	$P^a$
	Branca		Negra					
	%	N	%	N				
Endometriose								
<i>GSTM1</i>	53	23	29	2				
<i>GSTM1</i> nulo	47	20	71	5	2,87	0,50	16,47	0,41
Total	100	43	100	7				
<i>GSTT1</i>								
<i>GSTT1</i> nulo	67	29	71	5				
<i>GSTT1</i> nulo	33	14	29	2	0,82	0,14	4,81	0,82
Total	100	43	100	7				
Controle								
<i>GSTM1</i>	21	6	20	1				
<i>GSTM1</i> nulo	79	22	80	4	1,09	0,10	11,66	0,60
Total	100	28	100	5				
<i>GSTT1</i>								
<i>GSTT1</i>	36	10	40	2				
<i>GSTT1</i> nulo	64	18	60	3	0,83	0,11	5,85	0,74
Total	100	28	100	5				

<sup>a</sup> Valor  $P$  do teste de Odds Ratio

Na tabela XIII comparamos o uso de anticoncepcional (AC) nos grupos de mulheres com endometriose férteis (24) e o grupo controle (46), com relação ao polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. No grupo endometriose e fértil (endo+fert), 15 mulheres confirmaram o uso de anticoncepcional, quando analisado o polimorfismo *GSTM1* no grupo de mulheres que confirmaram o uso de AC foi detectado 67% (10/15) de frequências genotípicas positivas e 33% (5/15) de *GSTM1* nulo. No grupo controle 16 mulheres afirmaram o uso de AC sendo encontrado 19% (3/16) de frequências genotípicas positivas e 81% (13/16) de *GSTM1* nulo. A frequência positiva do *GSTM1* foi 3,52 vezes maior no grupo de mulheres com endometriose 67% (10/15) comparado ao grupo controle 19% (3/16), sendo esta diferença estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTM1*, sendo  $p=0,01$ .

O polimorfismo *GSTT1*, no grupo endo+fert, foi detectado com 67% (10/15) de frequência positiva no grupo que confirmou o uso de AC e 33% (5/15) de *GSTT1* nulo. No grupo controle a frequência positiva do *GSTT1* foi 31% (5/16) e 69% (11/16) de *GSTT1*

nulo. A frequência positiva do *GSTT1* foi 2,16 vezes maior no grupo com endometriose e fértil 67% (10/15) quando comparado com o grupo controle 31% (5/16), contudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTT1*, sendo  $p=0,10$ .

**Tabela XIII:** Comparação do uso de anticoncepcional nos grupos de mulheres com endometriose e férteis (end+fert) e o grupo controle (Cont).

Grupos/ Variáveis	Anticoncepcional				OR	Min	Max	ª P
	%	End Fert	%	Cont				
Uso de anticoncepcional								
<i>GSTM1</i>	67	10	19	3				
<i>GSTM1</i> nulo	33	5	81	13	8,6667	1,6614	45,2095	0,0194
Total	100	15	100	16				
<i>GSTT1</i>	67	10	31	5				
<i>GSTT1</i> nulo	33	5	69	11	4,4000	0,9753	19,8513	0,1069
Total	100	15	100	16				
Não usa anticoncepcional								
<i>GSTM1</i>	33	3	30	9				
<i>GSTM1</i> nulo	67	6	70	21	01,1667	0,2377	5,7255	0,8245
Total	100	9	100	30				
<i>GSTT1</i>	67	6	47	14				
<i>GSTT1</i> nulo	33	3	53	16	2,2857	0,4800	10,8832	0,5012
Total	100	9	100	30				

ª Valor de P do teste Fisher

No grupo endometriose e fértil (endo+fert), 9 mulheres confirmaram que não usam anticoncepcional, quando analisado o polimorfismo *GSTM1* foi detectado 33% (3/9) de frequências genotípicas positivas e 67% (6/9) de *GSTM1* nulo. No grupo controle 30 mulheres negaram o uso de AC, foi encontrado 30% (9/30) de frequências genotípicas positivas e 70% (21/30) de *GSTM1* nulo. A frequência positiva do *GSTM1* foi 1,1 vezes maior no grupo de mulheres com endometriose fértil 33% (3/9) comparado ao grupo controle 30% (9/30), contudo não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTM1*, sendo  $p=0,82$ .

O polimorfismo *GSTT1*, no grupo endo+fert, foi detectado com 67% (6/9) de frequência positiva no grupo que negou o uso de AC e 33% (3/9) de *GSTT1* nulo. No

grupo controle que negou o uso de AC a frequência positiva do *GSTTI* foi 47% (14/30) e 53% (16/30) de *GSTTI* nulo. A frequência do *GSTTI* nulo foi 1,60 vezes maior no grupo controle 53% (16/30) quando comparado ao grupo com endometriose e fértil 33% (3/9), contudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTTI*, sendo  $p=0,50$ .

Na tabela XIV analisamos os polimorfismo *GSTMI* e *GSTTI* com a variável atividade física (AF). No grupo endometriose (fértil + infértil), com 50 mulheres, 31 mulheres afirmaram que praticam alguma atividade física, neste grupo foi detectado 55% (17/31) com frequência positiva do *GSTMI* e 45% (14/31) de *GSTMI* nulo. No grupo controle 30 mulheres afirmaram praticar AF, destas 23% (7/30) apresentaram frequências positivas do *GSTMI* e 77% (23/30) de *GSTMI* nulo. A frequência positiva do *GSTMI* foi 2,39 vezes maior no grupo endometriose 55% (17/31) comparado ao grupo controle 23% (7/30), esta diferença foi estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTMI*, sendo  $p=0,02$ .

Ao analisarmos a frequência positivas do *GSTTI* no grupo endometriose foi detectado 58% (18/31) e 42% (13/31) do *GSTTI* nulo entre as mulheres que confirmaram a prática de AF. No grupo controle entre as que afirmaram praticar AF, 43% (13/30) apresentaram frequências positivas do *GSTTI* e 57% (17/30) de *GSTTI* nulo. A frequência positiva do *GSTTI* foi 1,34 vezes maior no grupo endometriose 58% (18/31) comparado ao grupo controle 43% (13/30), contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTTI*, sendo  $p=0,37$ .

No grupo de mulheres com endometriose que negaram a prática de AF com relação ao polimorfismo *GSTMI* foi encontrado 42% (8/19) de frequência positiva e 58% (11/19) do *GSTMI*. No grupo controle entre as que negaram praticar AF, 31% (5/16) apresentaram frequências positivas do *GSTMI* e 69% (11/16) de *GSTMI* nulo. A frequência positiva do *GSTMI* foi 1,35 vezes maior no grupo endometriose 52% (8/19) comparado ao grupo controle 31% (5/16), contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTMI*, sendo  $p=0,75$ .

Com relação a frequência positiva do *GSTTI* no grupo endometriose que negou a prática de AF foi detectado 84% (16/19) e 16% (3/19) do *GSTTI* nulo. No grupo controle entre as que negaram praticar AF, 37% (6/16) apresentaram frequências positivas do *GSTTI* e 63% (10/16) de *GSTTI* nulo. A frequência do *GSTTI* nulo foi 3,93 vezes maior no

grupo controle 63% (10/16) comparado ao grupo endometriose 16% (3/19), sendo esta diferença estatisticamente significativa entre estes grupos com relação ao *GSTTI*,  $p=0,01$ .

**Tabela XIV:** Comparação da variável atividade física com o polimorfismo *GSTMI* e *GSTTI* nos grupos endometriose (fértil + infértil) e grupo controle.

Grupos/ Variáveis	Atividade física				OR	Min	Max	$P^a$
	Endometriose		Controle					
	%	N	%	N				
<b>Atividade Física</b>								
<i>GSTMI</i>	55	17	23	7				
<i>GSTMI</i> nulo	45	14	77	23	3,98	1,31	12,01	0,02
Total	100	31	100	30				
<b><i>GSTTI</i></b>								
<i>GSTTI</i>	58	18	43	13				
<i>GSTTI</i> nulo	42	13	57	17	1,81	0,65	4,99	0,37
Total	100	31	100	30				
<b>Sem Atividade Física</b>								
<i>GSTMI</i>	42	8	31	5				
<i>GSTMI</i> nulo	58	11	69	11	1,60	0,39	6,45	0,75
Total	100	19	100	16				
<b><i>GSTTI</i></b>								
<i>GSTTI</i>	84	16	37	6				
<i>GSTTI</i> nulo	16	3	63	10	8,88	1,80	43,82	0,01
Total	100	19	100	16				

<sup>a</sup> Valor  $P$  do Teste Odds Ratio

A tabela XV apresenta a frequência do tabagismo entre as mulheres estudadas. No grupo endometriose (fértil e infértil), com 50 mulheres, e no grupo controle com 46 mulheres, apenas três confirmaram fumar em cada grupo.

Ao analisarmos as mulheres com endometriose e fumantes não foi encontrado frequência positiva do polimorfismo *GSTMI*, sendo assim, detectado 100% (3/3) de *GSTMI* nulo. No grupo de mulheres controle fumantes também não foi detectado a frequência positiva do polimorfismo *GSTMI*, sendo assim, detectado 100% (3/3) de *GSTMI* nulo de ausência. Como a distribuição das frequências positivas do *GSTMI* e *GSTMI* nulo foram idênticas entre os grupos estudados, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa.

Não foi encontrada frequência do gene *GSTTI* nulo no grupo endometriose e controle, entre as mulheres que afirmaram fumar, tendo assim 100% (3/3) de frequência positiva do *GSTTI* tanto no grupo com endometriose como no controle. Como não houve

diferencia entre as frequências analisadas, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa neste estudo.

No grupo de mulheres com endometriose que negaram fumar foi encontrado 53% (25/47) de frequência positiva do *GSTMI* e 47% (22/47) de *GSTMI* nulo. No grupo controle foi encontrado 28% (12/43) de frequência positiva do *GSTMI* e 72% (31/43) de *GSTMI* nulo. A frequência positiva do *GSTMI* foi aproximadamente o dobro no grupo com endometriose 53% (25/47) comparado ao grupo controle 28% (12/43), sendo esta diferença estatisticamente significativa,  $p=0,02$ .

**Tabela XV:** Comparação da variável hábito de fumar com os polimorfismos *GSTMI* e *GSTTI* nos grupos endometriose (fértil e infértil) e grupo controle.

Grupos/ Variáveis	Endometriose		Controle		Fumo			$P^a$
	%	N	%	N	OR	Min	Max	
Fumantes								
<i>GSTMI</i>	0	0	0	0				
<i>GSTMI</i> nulo	100	3	100	3	-	-	-	-
Total	100	3	100	3				
<i>GSTTI</i>	100	3	100	3				
<i>GSTTI</i> nulo	0	0	0	0	-	-	-	-
Total	100	3	100	3				
Não fumantes								
<i>GSTMI</i>	53	25	28	13				
<i>GSTMI</i> nulo	47	22	72	10	2,93	1,21	7,02	0,02
Total	100	47	100	23				
<i>GSTTI</i>	66	31	37	16				
<i>GSTTI</i> nulo	34	16	63	27	3,26	1,37	7,75	0,01
Total	100	47	100	43				

<sup>a</sup> Valor  $P$  do Teste Odds Ratio

Ao analisarmos o polimorfismo *GSTTI* no grupo de mulheres com endometriose que negaram fumar, foi encontrado 66% (31/47) de frequência positiva do *GSTTI* e 34% (16/47) de *GSTTI* nulo. No grupo controle foi encontrado 37% (16/43) de frequência positiva do *GSTTI* e 63% (27/43) de *GSTTI* nulo. A frequência do *GSTTI* nulo foi 1,85 vezes maior no grupo controle 63% (27/43) comparado ao grupo com endometriose 34% (16/47), sendo esta diferença estatisticamente significativa,  $p=0,01$ .

A tabela XVI apresenta os dados referente à caracterização das amostras analisadas quanto ao consumo de álcool e os polimorfismo *GSTMI* e *GSTTI*, nos grupos endometriose (fértil e infértil) contendo 50 mulheres, e o grupo controle (n=46). Verificou-

se que no grupo de mulheres com endometriose somente cinco mulheres confirmaram o consumo de álcool e no grupo controle 13 mulheres.

No grupo endometriose que afirmou consumir álcool o polimorfismo *GSTM1* teve frequência positiva de 60% (3/5) e 40% (2/5) do *GSTM1* nulo. No grupo controle que afirmaram consumir álcool verificou-se 23% (3/13) de frequência positiva do *GSTM1* e 77% (10/13) de *GSTM1* nulo. A frequência positiva do *GSTM1* foi 2,60 vezes maior no grupo com endometriose (60%) comparado ao grupo controle (23%), contudo essa diferença não é estatisticamente significativa, sendo  $p=0,53$ .

No grupo de endometriose que consome álcool o polimorfismo *GSTT1* teve frequência positiva de 80% (4/5) e 20% (1/5) de *GSTT1* nulo. No grupo controle que consome álcool verificou-se 38% (5/13) de frequência positiva e 62% (8/13) de *GSTT1* nulo. O *GSTT1* nulo teve aproximadamente o triplo de frequência no grupo controle (62%) comparado ao grupo endometriose (20%), contudo essa diferença não é estatisticamente significativa, sendo  $p=0,29$ .

**Tabela XVI:** Comparação da variável hábito de ingerir bebida alcoólica com os polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos endometriose (fértil e infértil) e o grupo controle.

Grupos/ Variáveis	Álcool				OR	Min	Max	$P^a$
	Endometriose		Controle					
	%	N	%	N				
Consome Álcool								
<i>GSTM1</i>	60	3	23	3	5,00	-	-	0,35
<i>GSTM1</i> nulo	40	2	77	10				
Total	100	5	100	13				
<i>GSTT1</i>	80	4	38	5	6,40	-	-	0,29
<i>GSTT1</i> nulo	20	1	62	8				
Total	100	5	100	13				
Não consome Álcool								
<i>GSTM1</i>	49	22	27	9	2,55	0,97	6,67	0,09
<i>GSTM1</i> nulo	51	23	73	24				
Total	100	45	100	33				
<i>GSTT1</i>	67	30	42	14	2,71	1,07	6,86	0,057
<i>GSTT1</i> nulo	33	15	58	19				
Total	100	45	100	33				

<sup>a</sup> Valor  $P$  do Teste Exato de Fisher

Ao analisar as mulheres que negaram consumir álcool no grupo com endometriose o polimorfismo *GSTM1* teve frequência positiva de 49% (22/45) e 51% (23/45) do *GSTM1* nulo. No grupo controle entre as mulheres que negaram consumir álcool verificou-se 27% (9/33) de frequência positiva do *GSTM1* e 73% (24/33) de *GSTM1* nulo. A frequência

positiva do *GSTM1* foi 1,81 vezes maior no grupo com endometriose (49%) comparado ao grupo controle (27%), contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa,  $p=0,09$ .

Analisando o polimorfismo *GSTT1* no grupo com endometriose que negou o consumo álcool, a frequência positiva foi de 67% (30/45) e 33% (15/45) de *GSTT1* nulo. No grupo controle entre as mulheres que negaram o consumo de álcool verificou-se 42% (14/33) de frequência positiva e 58% (19/33) de *GSTT1* nulo. O *GSTT1* nulo teve 1,75 vezes maior frequência no grupo controle (58%) comparado ao grupo endometriose (33%), contudo essa diferença não é estatisticamente significativa, sendo  $p=0,057$ .

A correlação da frequência dos genótipos Arg/Arg e Arg/Pro + Pro/Pro da *p53* associados aos polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1*, entre os grupo endometriose ( $n=50$ ) e controle ( $n=40$ ), esta demonstrada na tabela XVII.

No grupo endometriose o genótipo *GSTM1* + Arg/Arg foi encontrado em 20% (10/50), *GSTM1*nulo + Arg/Arg 16% (8/50), *GSTM1* + Arg/Pro + Pro/Pro 30% (15/50) e *GSTM1*nulo + Arg/Arg + Pro/Pro 34% (17/50). No grupo controle a frequência do *GSTM1* + Arg/Arg foi 10% (4/40), *GSTM1*nulo + Arg/Arg 48% (19/40), *GSTM1* + Arg/Pro + Pro/Pro 10% (4/40) e *GSTM1*nulo + Arg/Pro + Pro/Pro 32% (13/40). A presença do *GSTM1* associado à Arg/Arg teve o dobro de frequência no grupo endometriose (20%) comparado ao grupo controle (10%), a presença do polimorfismo *GSTM1* associado à Arg/Pro + Pro/Pro foi três vezes maior no grupo endometriose (30%) comparado ao grupo controle (10%), sendo estas diferenças estatisticamente significantes,  $p= 0,0046$ .

**Tabela XVII:** Distribuição da frequência dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *p53* nos grupos endometriose (endo) e controle.

Genótipo	Endo		Controle		$\chi^2$	G L	$P^a$
	%	N	%	N			
<i>GSTM1</i> +Arg/Arg	20	10	10	4	13,00	3	0,004
<i>GSTM1</i> nulo+Arg/Arg	16	8	48	19			
<i>GSTM1</i> + Arg/Pro+Pro/Pro	30	15	10	4			
<i>GSTM1</i> nulo+Arg/Pro+Pro/Pro	34	17	32	13			
Total	100	50	100	40			
<i>GSTT1</i> +Arg/Arg	28	14	23	9	12,12	3	0,007
<i>GSTT1</i> nulo+Arg/Arg	8	4	35	14			
<i>GSTT1</i> +Arg/Pro+Pro/Pro	40	20	17	7			
<i>GSTT1</i> nulo+Arg/Pro+Pro/Pro	24	12	25	10			
Total	100	50	100	40			

<sup>a</sup> Valor  $P$  do teste  $\chi^2$  (2x4)

A associação dos polimorfismo *GSTT1* + Arg/Arg no grupo endometriose teve frequência de 28% (14/50), *GSTT1*nulo + Arg/Arg 8% (4/50), *GSTT1* + Arg/Pro + Pro/Pro 40% (20/50) e *GSTT1*nulo + Arg/Pro + Pro/Pro 24% (12/50), No grupo controle 23% (9/40) apresentaram *GSTT1* + Arg/Arg, 35% (14/40) *GSTT1*nulo + Arg/Arg, 17% (7/40) *GSTT1* + Arg/Pro + Pro/Pro e 25% (10/40) *GSTT1*nulo + Arg/Pro + Pro/Pro. A associação do *GSTT1*nulo + Arg/Arg teve frequência 4 vezes maior no grupo controle (35%) comparado ao grupo endometriose (8%), *GSTT1* + Arg/Pro + Pro/Pro teve aproximadamente o dobro de frequência no grupo endometriose (40%) comparado ao grupo controle (17%), sendo estas diferenças estatisticamente significantes, p= 0,0070.

## 6- Discussão

A endometriose é uma doença complexa, devido ao seu perfil de expressão gênica, inúmeros estudos tem sido realizados, mas poucos foram além de classificar os subtipos de endometriose baseados em padrões de expressão e identificar as possíveis vias envolvidas na endometriose (Zhao et al, 2009). Possivelmente a endometriose é uma doença poligênica/multifatorial, causada pela interação entre múltiplos genes e fatores ambientais. Tais condições não seguem claramente os padrões da herança Mendeliana (Bischoff e Simpson, 2000). A hipótese diagnóstica de endometriose inicialmente é elaborada baseando-se na história clínica da paciente, seguido por ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética (Farquhar, 2007). Na maioria dos casos o diagnóstico é feito após a cirurgia e estadiada com base na localização, extensão e tipo de lesão por laparoscopia, contudo algumas lesões endometrióticas podem passar despercebidas na cirurgia, podendo a doença ser confundida com algumas condições menores (Barlow e Kennedy, 2005). Daí a importância de se encontrar marcadores moleculares para auxiliar no diagnóstico dessa patologia.

As evidências mais sólidas até hoje ligando os polimorfismos específicos para a endometriose vem de estudos que investigam as enzimas de fase II de desintoxicação. Uma revisão sistemática e de meta-análise de estudos que investigam as variantes da glutathione S-transferase *GSTM1* e *GSTT1*, demonstraram uma associação consistente do polimorfismo *GSTT1* e endometriose, com 29% de aumento no risco de endometriose em portadoras do genótipo *GSTT1* nulo (Tempfer et al, 2009).

No nosso estudo o grupo endometriose foi composto por mulheres em idade reprodutiva com média de 33,32 anos, já o grupo controle por mulheres com idade mais elevada, com média de 37,40 anos, que não tiveram nenhuma queixa relacionada à endometriose na idade reprodutiva, período no qual a mulher está mais susceptível ao desenvolvimento desta patologia.

No nosso estudo observamos que pacientes com endometriose apresentaram maior presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, enquanto que o grupo controle, formado por pacientes sem clínica relacionada à endometriose, tiveram maior ausência destes genes, mostrando que possivelmente *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo não estão relacionados com a proliferação celular da endometriose.

No estudo de Hur e colaboradores (2004), também não foi encontrada associação dos polimorfismos *GSTMI* e *GSTT1* com o desenvolvimento da endometriose. O estudo foi feito com mulheres coreanas para analisar os polimorfismos *GSTMI*, *GSTT1* e *GSTPI* e endometriose, teve como grupo de estudo 194 mulheres com endometriose confirmada através de laparoscopia e 259 que foram submetidas à laparoscopia e laparotomia e não tiveram o diagnóstico da patologia, compondo o grupo controle. Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo endometriose (57,7%) e o grupo controle (56%) para o polimorfismo *GSTMI* nulo. O mesmo ocorreu com o polimorfismo *GSTT1*, onde 53,6% do grupo endometriose teve *GSTT1* nulo e no grupo controle 48,3%. Analisaram as mesmas sequências dos genes estudados por nós.

Ao contrário de Baranova e colaboradores (1997) que mostrou a possibilidade de alelos homocigotos do *GSTMI* nulo terem papel no desenvolvimento da endometriose em 86% (n=50) de casos quando comparado com 45,8% (n=72) dos controles, mulheres não afetadas; contudo não analisou a mesma frequência gênica deste estudo. O presente trabalho não encontrou resultados que sustentem que o *GSTMI* nulo esteja relacionado com a predisposição a endometriose. Contudo ambos estudos utilizaram sequências gênicas diferentes para analisar o gene *GSTMI*, mas o grupo de estudo foi semelhante, visto que, em nosso estudo as mulheres caucasianas foram predominantes, o que também ocorreu com o estudo de Baranova e colaboradores (1997), que foi feito com mulheres de origem francesa.

Já Guo (2005) não encontrou o mesmo dados que Baranova e colaboradores (1997) para o *GSTMI* nulo, mas ele encontrou dados que sugerem a relação do *GSTT1* nulo com a endometriose. Foi feita uma meta análise sobre a associação do polimorfismo *GSTMI* e *GSTT1* com endometriose, sendo que 14 estudos eram com *GSTMI*, tendo 1.539 casos de endometriose e 1.805 controles, 9 estudos com *GSTT1*, tendo 746 casos de endometriose e 834 controles. Não foi encontrada evidências de que mulheres com *GSTMI* nulo tenham risco aumentado de desenvolver endometriose em comparação com as mulheres com outros genótipos. Para o *GSTT1* nulo, foi mostrado que existe um risco de estar associado com o desenvolvimento da endometriose, 29 % maior, quando comparado com outros genótipos, o mesmo resultado foi encontrado no trabalho de meta análise de Tempfer e colaboradores (2009). Contudo em nosso estudo foi encontrado maior frequência do gene *GSTT1* nulo no grupo controle, quando comparado com o grupo de mulheres com endometriose.

Já Jun e colaboradores (2003), encontraram frequência significativa dos dois genes, *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo, 0,721 (49/68) e 0,779 (53/68) respectivamente, nas pacientes com endometriose (68 mulheres), quando comparado com o grupo controle (28 mulheres) que apresentou 0,429 (12/28) *GSTM1* nulo e 0,321 (9/28) *GSTT1* nulo. Analisou a mesma sequência do gene *GSTT1* estudada por nós, contudo diferiu da sequência do gene *GSTM1*.

A glutathione desempenha um papel importante em uma grande variedade de processos celulares, incluindo a diferenciação celular, proliferação e apoptose de processos celulares, e como resultado, distúrbios na homeostase. A glutathione S-transferase está implicada na etiologia e/ou progressão de várias doenças humanas, incluindo câncer, doenças do envelhecimento, fibrose cística, doenças cardiovasculares, inflamatórias, imunológicas, metabólicas e doenças neurodegenerativas (Ballatori et al, 2009; Ryberg et al, 1997; Losi-Guembarovski e Cólus, 2001; Sivoňová et al, 2009; Baxter et al, 2001).

Baxter e colaboradores (2001) analisaram o polimorfismo de presença/ausência do *GSTM1* em um grupo de pacientes portadoras de endometrioses, outro portador de câncer ovariano e em um grupo controle, todas residentes no sudeste da Inglaterra. Quando comparado o grupo de mulheres com endometriose e o controle, não foi encontrada significância, e o grupo controle apresentou um maior número de ausência do gene do que o grupo caso. Quando comparado o grupo portador de câncer ovariano com o controle, o resultado foi significativo, sendo o gene *GSTM1* nulo com maior prevalência nas pacientes com câncer ovariano. Sendo assim, concluíram que o gene *GSTM1* nulo não está associado com a susceptibilidade da endometriose, contudo ele pode predispor a transformação de lesões malignas no endométrio em câncer de células claras do endométrio ovariano. A sequência do gene *GSTM1* que foi analisada não é a mesma do nosso estudo.

O presente estudo encontrou uma frequência positiva do polimorfismo *GSTM1* no grupo de mulheres com endometriose e que se classificaram como brancas (53%) já o *GSTT1* teve maior frequência positiva no grupo de mulheres que se classificaram como negras (71%). No grupo controle foi encontrado maior frequência do *GSTM1* nulo no grupo de mulheres que se classificaram como negras, já o *GSTT1* nulo teve maior frequência no grupo de mulheres que se disseram brancas (tabela XII). Gattas e Soares – Vireira (2000) investigaram mutações em genes de indivíduos saudáveis de São Paulo, Brasil, sendo 206 brancos e 86 negros, foi encontrado para o genótipo *GSTM1* ausente uma frequência significativamente maior entre os indivíduos caucasianos (60,2%) comparado aos negros (41,9%).

Arruda e colaboradores (1998), estudaram os genótipos ausentes *GSTMI* e *GSTTI* em um grupo de brasileiros provenientes de três regiões distintas do país: Norte, Nordeste e Sudeste, encontrando maior frequência de *GSTMI* ausente entre os caucasianos (55%), seguido por 33% dos negros e 20% entre os índios da Amazônia, já o *GSTTI* teve uma distribuição homogênea do genótipo ausente entre os descendentes brancos e negros (18,5 e 19% respectivamente), com uma menor frequência entre os índios da Amazônia (11%). Cotton e colaboradores (1999), pesquisaram que as frequências do genótipo *GSTTI* ausente são inferiores aos do *GSTMI* ausente em populações africanas, afro – americanas e caucasóides, sendo a faixa de frequência entre africanos de 15 – 26% e nos europeus de 10 – 21%.

Mengert em 1966, descreveu que a incidência da endometriose atingia menos mulheres negras devido ao início precoce da vida sexual, e porque estas mulheres tinham mais gestações do que as brancas, o que atuava como proteção contra a endometriose, ele completou dizendo que com as mudanças nos hábitos e a melhora na situação econômica destas mulheres, iria causar o aumento na taxa de endometriose, o que mostraria que esta patologia não tem relação nenhuma com etnia.

Contudo no trabalho de Missmer e colaboradores (2004), as mulheres afro-americanas tiveram uma menor incidência de endometriose quando comparado com mulheres asiáticas e caucasianas, apesar de se discutir muito que este resultado se deva ao mal diagnóstico feito nas minorias racias, estes resultados são evidentes até mesmo entre aquelas que tiveram um exame clínico durante os dois últimos anos do estudo.

Em nosso estudo encontramos diferença significativa no uso de pílulas contraceptivas e o *GSTMI* no grupo que afirmou utilizar a pílula, com  $p=0,01$ . Contudo nos outros grupos analisados não foi encontrado diferença significativa tanto ao analisar o *GSTMI* quanto o *GSTTI*, já Vessey e colaboradores (1993), mostraram que a endometriose é suprimida durante o uso de pílula contraceptivos, e que com a interrupção da pílula a doença torna a aparecer. Os resultados mostraram que o risco de endometriose foi baixo nas mulheres que tomavam contraceptivos orais (risco relativo de 0-4, intervalo de confiança de 95% para 0,7 0-2), contudo maior nas mulheres que haviam tomado anteriormente (1,8; 1-0 a 3 -1 em mulheres que tinham parado 25-48 meses) em comparação com mulheres que nunca haviam tomado a pílula. Sugerindo assim, que os contraceptivos orais mascaram os sintomas da endometriose.

Costa (2010) analisou o polimorfismo do gene receptor PROGINS em mulheres com endometriose e sem clínica, com relação ao uso de contraceptivos, no grupo controle foi observado 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.

Quanto à prática de atividade física, foi encontrado diferença significativa entre os grupos endometriose e controle, relacionado ao *GSTMI*, no grupo que afirmou praticar atividade física, com  $p=0,02$ . Houve diferença significativa também quando analisou-se o *GSTTI* nos grupos endometriose e controle que negaram a prática de atividade física, com  $p=0,01$ . Dhillon (2003) fez um estudo caso - controle de 1990-1994, para analisar a associação da endometriose ovariana cística (endometrioma) com a atividade física, o estudo foi composto por 77 pacientes com a patologia e 735 controles com idade entre 18-39 anos, foi conduzido em Washington. Observou-se uma significativa diminuição de 70% do risco de endometriose associadas à atividade física recente, freqüente e regular de alta intensidade.

Não encontramos uma correlação entre a endometriose, os polimorfismos *GSTMI* e *GSTTI* e o tabagismo, nas mulheres que afirmaram fumar. Já no estudo prospectivo de Missmer e colaboradores (2004), que investigaram as relações dos fatores demográficos, antropométricos e estilo de vida de mulheres com endometriose, foi encontrado uma complexa relação da endometriose com o tabagismo. A taxa de endometriose não foi linearmente associada com a dose de tabagismo consumida antes do estudo, no entanto a relação com o tabagismo atual, durante o estudo, difere por situação, nos casos de infertilidade. Entre as mulheres sem relato de infertilidade, o tabagismo foi diretamente associado com o risco de desenvolver endometriose, contudo quando as mulheres já tinham relato de infertilidade, o tabagismo foi associado com o risco reduzido de desenvolver a doença.

Nosso estudo não encontrou associação entre endometriose e o consumo de álcool nos polimorfismos *GSTMI* e *GSTTI* estudados. Já Grodstein e colaboradores (1994), encontraram uma associação entre relatos de consumo de álcool e infertilidade devido a fator ovulatório ou endometriose. Foi encontrado um pequeno aumento no risco, mas significativo, de infertilidade ovulatória em mulheres com relato de consumo moderado de álcool, enquanto que este risco aumentou consideravelmente nas mulheres que bebem em

níveis mais elevados, em comparação, com as abstinências. Aumento no risco de endometriose foi encontrado em ambos níveis de consumo de álcool examinados. O risco de endometriose foi aproximadamente 50% mais elevado nos indivíduos que ingeriram qualquer tipo de álcool do que nos indivíduos controle.

Estudamos a associação do gene *p53* no códon 72 com os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* entre um grupo de mulheres com endometriose e outro sem clínica relacionada à patologia, foi encontrada associação significativa, indicando que estes polimorfismos podem atuar na proliferação da endometriose.

Resultado semelhante foi encontrado por Ribeiro Júnior e colaboradores (2009), que avaliaram o polimorfismo do gene *p53* no códon 72 em dois grupos de pacientes com endometriose, em que em um deles foi detectada infertilidade e no outro não. Não foi observado nenhuma diferença significativa na distribuição do polimorfismo *p53* no códon 72 entre os grupos ( $p = 0,0974$ ). Contudo foi encontrada associação significativa em pacientes com genótipo homozigoto ou heterozigoto para prolina e dor intensa ( $p < 0,001$ ). A presença do alelo prolina está mais ligada aos pacientes com infertilidade e com um quadro clínico mais grave da doença. Este estudo concluiu que o polimorfismo da *p53* pode ser usado como um marcador molecular para a endometriose associada a sintomas agravados e infertilidade, e, portanto, como um grande auxílio no diagnóstico da endometriose, prognóstico, orientação e tratamento desta doença.

## 7- Conclusão

1. Foi encontrado aproximadamente o dobro de presença do gene *GSTMI* no grupo com endometriose comparado ao grupo controle, o *GSTTI* nulo foi 1,84 vezes maior no grupo com controle comparado ao com endometriose, indicando estar mais relacionados com aspectos da distribuição normal na população do que com a proliferação da endometriose
2. Foi encontrado significância estatística dos polimorfismos *GSTTI* e *GSTMI* relacionado a tabagismo, anticoncepcionais e atividade física
3. Não foi encontrado significância estatística dos polimorfismos *GSTMI* e *GSTTI* relacionado com etnia e consumo de álcool
4. A frequência do alelo Arg/Arg juntamente com o polimorfismo *GSTMI* nulo foi 3 vezes maior no grupo controle comparado ao grupo com endometriose, já o *GSTMI* associado a estes alelos foi o dobro no grupo endometriose comparado com o grupo controle. A frequência do alelo Arg/Arg associado ao *GSTTI* nulo foi 4 vezes maior no grupo controle, comparado ao grupo endometriose.
5. A frequência do alelo Arg/Pro + Pro/Pro associado ao *GSTMI* foi 3 vezes maior no grupo com endometriose comparado ao grupo controle, a frequência dos alelos Arg/Pro + Pro/Pro associado ao *GSTTI* foi aproximadamente o dobro no grupo com endometriose comparado ao grupo controle.

## 8- Referências Bibliográficas

Abdel-Rahman, SZ; El-Zein, RA; Anwar, WA; Au, WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 10: 229-233.1996

Abrão MS, Podgaec S, Dias Jr JA. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. *Prat Hosp.* 50:73-77. 2007.

Agarwal A, Gupta S and Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3:28. 2005.

Almeida GLF.; Endometriose: Tratamento Clínico E Cirúrgico. *JBM., RO:* 109-16. 1986.

American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis a guide for patients. 2007.

Aris A. Endometriosis-associated ovarian cancer: A tenyear cohort study of women living in the Estrie Region of Quebec, Canada. *Aris Journal of Ovarian Research,* 3:2. 2010.

Arruda VR, Grignoli CE, Gonçalves MC, Soares MC; Menezes R, Saad ST and Costa FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S - transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clinical Genetics.* 54:210-214. 1998.

Attar R, Cacina C, Sozen S, Attar E and Agachan B. DNA repair genes in endometriosis. *Genetics and Molecular Research* 9 (2): 629-636; 2010.

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K and Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem. March;* 390(3): 191–214. 2009.

Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, Albuissou E, Perriot S, Glowaczower E, Bruhat MA, Baranov V and Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and

susceptibility to endometriosis in a French population. *Molecular Human Reproduction*. 3(9): 775–780.1997

Barlow DH and Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 56:345-56, 2005.

Baxter SW, Thomas EJ, Campbell IG. GSTM1 null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian câncer. *Carcinogenesis*. 22 (1): 63-66.2001.

Bazot M, Bornier C, Dubernard G, Roseau G, Cortez A and i E. Accuracy of magnetic resonance imaging and rectal endoscopic sonography for the prediction of location of deep pelvic endometriosis. *Human Reproduction* Vol.22, No.5 pp. 1457–1463, 2007.

Bhatt RV. Environmental influence on reproductive health. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. Volume 70, Issue 1, Pages 69-75, 1 July 2000.

Bianco B, Christofolini DM, Souza AMB, Barbosa CP. O papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose: revisão da literatura. *Arq Bras Ciên Saúde*, Santo André, v.35, n.2, p.103-10, Mai/Ago 2010.

Bischoff FZ and Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Human Reproduction*. 6(1): 37-44. 2000.

Brosens I e Benagiano G. Endometriosis, a modern syndrome. *Indian J Med Res*. June; 133(6): 581–593. 2011.

Bulcão R, Maria LS, Charão M, Moro A, Roehrs M, Garcia SC. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*. 31(6):1343-1348. 2008.

Bulun SE, Zeitoun K, Takayama K, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M and Sasano A. Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocrine-Related Cancer*. 6 293-301. 1999.

Carvalho CV, D'Amora P, Sato H, Girão MJBC, Lima JR, Silva IDCG, Schor E. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose pélvica. RBGO - v. 26, nº 8, 2004.

Cataneo AC, Déstro GFG, Ferreira LC, Chamma KL, Sousa DCF. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*) planta daninha. Viçosa-MG. 21(2):307-312. 2003.

Chapron C and Dubuisson JB. Laparoscopic treatment of deep endometriosis located on the uterosacral ligaments. Human Reproduction vol.11 no.4 pp.868-873, 1996.

Costa IR. Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética Molecular da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 09/06/2010.

Cotton SC, Sharp L, Little J and Brockton N. Glutathione S-Transferase polymorphisms and colorectal cancer: a huge. American Journal of Epidemiology. Vol. 151, No. 1, 2000.

Coggan M, Whitbread L, Whittington A and Board P. Structure and organization of the human Theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. Biochem. J. 334, 617±623. 1998.

Cramer DW, Hornstein MD, Ng WG and Barbieri RL. Endometriosis associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). Molecular Human Reproduction. 2 (3):149-152. 1996.

Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, Albrecht B, Gibson M, Stadel BV, Schoenbaum SC. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. JAMA. 255:1904-1908.1986.

Critchley HOD, Kelly RW, Baird DT and Brenner RM. Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding. Reproductive Biology and Endocrinology. 4(Suppl 1):S5.2006.

Dhillon PK and Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *American journal of epidemiology*. Oxford Univ Press. 2003.

Dunselman GAJ, Groothuis PG, Goeij AFPM and Evers JLH. The mesothelium, teflon or velcro? Mesothelium in endometriosis pathogenesis. *Human Reproduction*. 16 (4): 605-607. 2001.

Ertunc D, Aban M, Tok EC, Tamer L, Arslan M and Dilek S. Glutathione-S transferase P1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis. *Human Reproduction*. 20(8): 2157–2161. 2005.

Farquhar C. Endometriosis. *BMJ*. February 3; 334(7587): 249–253. 2007.

Fraser IS. Recognising, understanding and managing endometriosis. *J Hum Reprod Sci*. jul–dec; 1(2): 56–64. 2008.

Fryer AA, Zhao L, Aldersea J, Pearson WR and Strange RC. Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 A,B and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus. *Biochem. J*. 295, 313-31. 1993.

Gattas GJF and Soares-Vieira JA. Cytochrome P450 - 2E1 and glutathione S -transferase um polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup. Med*. Vol. 50, No. 7, pp. 508-511, 2000.

Grodstein F, Goldman MB, and Cramer DW. Infertility in women and moderate alcohol use. *Am J Public Health*. September; 84(9): 1429–1432. 1994.

Guo SW. Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies. *Molecular Human Reproduction*. 11 (10): 729–743.2005.

Guo SW. The association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving dioxin detoxification enzymes: A systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 124, 134–143. 2006.

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. *Molecular Human Reproduction*. 7(11): 1073-1078. 2001.

Halis G, Mechsne S, and Ebert AD. The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Dtsch Arztebl Int*. June; 107(25): 446–456. 2010.

Hastings JM and Fazleabas AT. A baboon model for endometriosis: implications for fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 4(Suppl 1): S7. 2006.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 45:51-88. 2005.

Hediger ML, Hartnett HJ and Louis GMB. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril*. November ; 84(5): 1366–1374. 2005.

Hsieh YY and Lin CS. P53 codon 11, 72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. *International Journal of Biological Sciences*. 2(4):188-193. 2006.

Huber PC and Almeida WP. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova*. 31(5):1170-1179. 2008.

Hur SE, Lee JY, Moon HS and Chung HW. Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Molecular Human Reproduction*. Vol.11, No.1 pp. 15–19, 2004.

Jackson B and Telner DE. Managing the misplaced approach to endometriosis. *Can Fam Physician*. November 10; 52(11): 1420–1424. 2006.

Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Sakamoto A, Tsutsumi O, Taketani Y, and Esumi H. Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *AJP* April. Vol. 150, No. 4. 1997.

Jun L, Xinmei Z, Yuli Q, Yinghui Y, Yifu S, Kaihong X and Jianyun X. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and endometriosis risk: a case-controlled study. *Chinese Medical Journal*, 116(5):777-780. 2003.

Katoh T, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N, Ookuma R, A-Bell D. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 17(9): 1855-1859. 1996.

Klemmt PAB, Phil D, Carver JG, Kennedy SH, Koninckx PR and Mardon HJ. Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity. *Fertil Steril*. March 85(3): 564–572. 2006.

Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM and D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 1: 123. 2003.

Losi-Guembarovski R and Cólus IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): ethnic distribution and relation with cancer *Semina: Ci. Biol. Saúde, Londrina*, v. 22, p. 3-9, jan./dez. 2001.

Manero MG, Royo P, Olartecoechea B and Alcázar JL. Endometriosis in a postmenopausal woman without previous hormonal therapy: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 3:135. 2009.

Mangtani P and Booth M. Epidemiology of endometriosis. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 47: 84-88. 1993.

Mengert WF. Racial contrasts in obstetrics and gynecology. *J Natl Med Assoc.* November; 58(6): 413–415.1966.

Miller MS, Mccarver DG, Bell DA, Eaton DL, Goldstein JA. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundamental and applied toxicology.* 40: 1-14. 1997.

Minici F, Tiberi F, Tropea A, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Campo S, Bompiani A, Lanzone A and Apa R. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. *Human Reproduction* Vol.23, No.3 pp. 530–537, 2008.

Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM and Hunter DJ. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *American Journal of Epidemiology.* 160:784–796. 2004.

Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, Treloar SA, Painter JN, Missmer SA, Kennedy SH and Zondervan KT. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Human Reproduction Update.* 14(5): 447–457. 2008.

Moore DT. Endometriosis, An Increasing Challenge. *J Natl Med Assoc.* September; 62(5): 337–341. 1970.

Morari EC, Lima ABC, Bufalo NE, Leite JL , Granja F and Ward LS. Role of glutathione S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 132: 521–528. 2006.

Mote PA, Balleine RL, McGowan EM and Clarke CL. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Human Reproduction*, Vol. 15, (Suppl. 3), pp. 48-56, 2000.

Nakata LC, Goloni-Bertollo EM, Santos I, Oliani AH, Vaz DCM, Oliveira GH, Pavarino-Bertelli EC. Biomarcadores de suscetibilidade à endometriose. *RBGO.* V.26, nº 4, 2004.

Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. Oct; 68(4):585-96. 1997.

Nominato NS, Prates LFVS, Lauar I, Morais J, Maia L, Geber S. Endometriose de cicatriz cirúrgica: estudo retrospectivo de 72 casos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 29(8):403-7. 2007.

Nouri K, Ott J, Krupitz B, Huber JC and Wenz R .Family incidence of endometriosis in first-, second-, and third-degree relatives: case-control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:85. 2010.

Pados G, Tympanidis J, Zafrakas M, Athanatos D and Bontis J. Ultrasound and MR-imaging in preoperative evaluation of two rare cases of scar endometriosis. *Cases Journal*, 1:9. 2008.

Passos E, Freitas F, Filho JSC, Facin A, Souza C and Salazar C. Endometriose. *Revista HCPA*. 20(2), 150-156. 2000.

Porpora MG, Medda E, Abballe A, Bolli S, Angelis I, Domenico A, Ferro A, Ingelido AM, Maggi A, Panici PB and Felip E. Endometriosis and organochlorinated environmental pollutants: a case-control study on Italian women of reproductive age. *Environ Health Perspect*. July; 117(7): 1070–1075. 2009.

Pasternak JJ. Uma introdução à genética molecular humana . Guanabara Koogan 2º Edição, pag 110. 2007.

Prowse AH, Manek S, Varma R, Liu J, Godwin AK, Maher ER, Tomlinson IPM, Kennedy SH. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int. J. Cancer*: 119, 556–562. 2006.

Pugsley Z and Ballard K. Management of endometriosis in general practice: the pathway to diagnosis. *British Journal of General Practice*, June 2007.

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GS7T1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. September, 6: 733-743. 1997.

Ribeiro Júnior CL, Arruda JT, Silva CTX and Moura KKVO. Analysis of p53 codon 72 gene polymorphism in Brazilian patients with endometriosis. *Genet. Mol. Res.* 8 (2): 494-499; 2009.

Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J and Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*. 14(4): 345–357. 2008.

Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, OGREID D, Ulvik A, Vu P and Haugen A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* vol.18 no.7 pp.1285–1289, 1997.

Sampson J.A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *The American Journal of Pathology*. March III(2). 1927.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Cadowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360 (1): 1–16. 2001.

Simoni M, Bakker E and Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology*, 27:240–249. 2004.

Schor E, Freitas V, Soares Júnior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: modelo experimental em ratas. *RBGO* - v. 21, nº 5, 1999.

Silva J, Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Cantos B, Rodriguez R, Larrondo FJ, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Concomitant Expression Of P16ink4a And P14arf In

Primary Breast Cancer And Analysis Of Inactivation Mechanisms. *The Journal Of Pathology*. Vol 199.; 289-297. Espanha. 2003.

Signorile PG, Baldi F, Bussani R, D'Armiento M, Falco MD, Bald A. Ectopic endometrium in human fetuses is a common event and sustains the theory of müllerianosis in the pathogenesis of endometriosis, a disease that predisposes to câncer. *J Exp Clin Cancer Res*. 28(1): 49, 2009.

Silva RCPC, Costa IR, Bordin BM, Silva CTX, Souza SR, Júnior CLR, Frare AB and Moura KKVO. RsaI polymorphism of the ER $\beta$  gene in women with endometriosis. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 465-470, 2011.

Sinaii N, Plumb K, Cotton L, Lambert A, Kennedy S, Zondervan K and Stratto P. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertil Steril*. March ; 89(3): 538–54, 2008.

Sivoňová M, Waczulíková I, Dobrota D, Matáková T, Hatok J, Račay P, and Kliment J. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, P1 and the risk of prostate cancer: a case-control study. *J Exp Clin Cancer Res*. 28(1): 32. 2009.

Souza SR. Análise do polimorfismo MspI do gene CYP1A1m1 (citocromo P450) e sua possível associação com a infertilidade em portadoras de endometriose. Dissertação em andamento de mestrado do programa de Pós-Graduação em Genética Mgene da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Comunicação pessoal, 2011.

Stefansson H, Geirsson RT, Steinthorsdottir V, Jonsson H, Manolescu A, Kong A, Ingadottir G, Gulcher J and Stefansson K. Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis. *Human Reproduction*. Vol. 17, No. 3, 555-559, March 2002.

Strange RC, Jones PW and Frye AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters* 112–113. 2000.

Stucker I, Hirvonen A, Waziers I, Cabelgienne A, Mitrunen K, C  n  e S, Besson EK, H  mon D, Beaune P and Lorient MA. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 23 (9): 1475-1481. 2002.

Talbot P and Riveles K. Smoking and reproduction: The oviduct as a target of cigarette Smoke. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3:52. 2005.

Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, and Fauser BCJM. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II—endometriosis. *Hum Reprod Update*. Jan–Feb; 15(1): 97–118, 2009.

Ueta J, Pereira NL, Shuhama IK. Biodegrada  o de Herbicidas e Biorremedia  o. *Rev. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Ano 2, Número 10 Setembro/Outubro. 1999.

Valadares JC, Ferreira LV, Filho HC, Silva MAR. Transtorno disfórico pré-menstrual, conceito, histórica, epidemiologia e etiologia. *Rev. Psiquiatr.clin.* v.33 n  3 São Paulo,2006.

Varma R, Rollason T, Gupta JK, Maher ER. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction*. 127 293-304. 2004.

Vassiliadis S, Relakis K, Papageorgiou A, Athanassakis I. Endometriosis and Infertility: A multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. *Clin Dev Immunol*. June; 12(2): 125–129. 2005.

Ventolini G, Horowitz GM and Long R. Endometriosis in adolescence: A long-term follow-up fecundability Assessment. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3:14. 2005.

Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ*. Volume 306 16, january ,1993.

Vitonis AF, Hankinson SE, Hornstein MD and Missmer SA. Adult physical activity and endometriosis risk. *Epidemiology*. January ; 21(1): 16–23, 2010.

Weed JC. Endometriosis in the Negro. *Annals of Surgery*, may 1955.

Wilkinson J and Clapper ML. Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine*, 216: 192-200.1997.

Witz CA, Dechaud H, Montoya-Rodriguez IA, Thomas MR, Nair AS, Centonze VE, Schenken RS. An in vitro model to study the pathogenesis of the early endometriosis lesion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 955:296-307. 2002.

Xu WH, Long J, Zheng W, Ruan Z, Cai Q, Cheng J, Xiang YB and Shu XO. Association of the progesterone receptor gene with endometrial cancer risk in a Chinese population. *Cancer*. June 15; 115(12): 2693–2700. 2009.

Zhang Q, Pi J, Woods CG and Andersen ME. Phase I to II cross - induction of xenobiotic metabolizing enzymes: a feedforward control mechanism for potential hormetic responses. *Toxicol Appl Pharmacol*. June 15; 237(3): 345–356.2009.

Zhao H, Wang Q, Bai C, He K and Pan Y. A cross-study gene set enrichment analysis identifies critical pathways in endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7:94. 2009.

## 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: \_\_\_\_\_, n° de  
prontuário: \_\_\_\_\_, n° 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:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_