



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

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS GENES *TP53* E  
*CYP1A1m1* EM BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO DE  
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE**

**ANA MANOELA MARIA DA SILVA**

**Goiânia, GO**

**2012**



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

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS GENES *TP53* E  
*CYP1A1m1* EM BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO DE  
PACIENTES COM ENDOMETRIOSE**

**ANA MANOELA MARIA DA SILVA**

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

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. KATIA KARINA VEROLLI DE O. MOURA**

**Goiânia, GO**

**2012**

S586a Silva, Ana Manoela Maria da.  
Análise do polimorfismo dos genes TP53 e CYP1A1m1  
em biópsia de endométrio de pacientes com endometriose  
[manuscrito] / Ana Manoela Maria da Silva. – 2012.  
89 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Genética,  
2012.

“Orientador: Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de O.  
Moura”.

1. Endometriose. 2. Polimorfismo. 3. CYP1A1. 4. TP53  
protein I. Título.

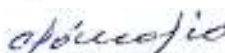
CDU: 618.1(043.2)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 25 DE JUNHO DE 2012 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM CONCEITO... *A*.....

**BANCA EXAMINADORA**



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



Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás  
(membro interno)



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva / UFG  
(membro externo)

**Saber Viver**  
(Cora Coralina)

Não sei... Se a vida é curta  
Ou longa demais pra nós,  
Mas sei que nada do que vivemos  
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:  
Colo que acolhe,  
Braço que envolve,  
Palavra que conforta,  
Silêncio que respeita,  
Alegria que contagia,  
Lágrima que corre,  
Olhar que acaricia,  
Desejo que sacia,  
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,  
É o que dá sentido à vida.  
É o que faz com que ela  
Não seja nem curta,  
Nem longa demais,  
Mas que seja intensa,  
Verdadeira, pura...  
Enquanto durar.

**Dedicatória**

Dedico essa conquista aqueles que dão sentido à minha vida,  
diariamente: Geralda, Maria, Hugo, Sancho, Pantera, Areta  
(*in memoriam*) e Divino (*in memoriam*) um mestre e doutor  
na alegria de viver.  
Amo muito vocês!

“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida.”

Vinicius de Moraes

### **Agradecimentos**

A **Deus** pela minha existência, pelo meu encontro com pessoas especiais ao longo da minha caminhada, pela força todos os dias, pela minha família, pelas oportunidades... Obrigada por deixar apenas “um par de pegadas na areia...”

À **minha mãe Geralda** por acreditar em mim desde quando eu era uma criatura de menos de um quilo, de nariz arrebitado, numa incubadora. Por ser exemplo em todos os aspectos e sempre estar ao meu lado! Por me estimular a seguir em frente e impulsionar os meus sonhos ... Obrigada por seu amor e sua dedicação sem limites.

Ao **meu avô Divino** minha eterna fonte de inspiração para uma vida plena de sorrisos e canções entoadas por assobios. Um ser que transbordava doçura e mantinha sempre um sorriso nos lábios. Obrigada por tudo que me ensinou, pelas histórias sobre a 2ª Guerra Mundial, por ter sido a figura masculina mais sublime para a construção do meu “eu”, por compartilharmos apenas boas lembranças e por sempre me sorrir em sonhos.

À **minha avó Maria** pelo zelo incessante desde meus primeiros dias. Pelo cafezinho doce, o almoço quentinho, o pudim furadinho, os bolos e biscoitos sempre numa atmosfera de nostalgia, conselhos e muitas histórias...

À **minha família**, por estarmos juntos sempre, perto ou longe, e pelos bons momentos que desfrutamos! Também agradeço pelos desentendimentos, afinal a vida não é só flores e diversas são as oportunidades que temos para amadurecer e nos tornarmos sempre melhores. Agradeço ainda aos meus fiéis “cãopanheiros” que tanto alegram meus dias!

Ao **Hugo Valentim** pelo amor esmerado ao longo desses sete anos e dois meses e pela paciência! Por ser companheiro, lado a lado... E se passa na frente, sempre me estimula a seguir em frente! Pelos sonhos que sonhamos e construímos dia a dia.

À minha professora de graduação **Dra. Alessandra Marques Cardoso** pelo incentivo e estímulo e pela amizade. Inspira-me sempre!

À **Dra. Isabel Cristina Carvalho Medeiros Francescantonio** pelos cuidados com a minha família e desde a minha infância. Posteriormente, minha professora de

graduação e orientadora na Liga Acadêmica de Bioquímica Clínica. À ela por toda disposição em me aconselhar, pelo incentivo, pelo carinho e pela presença num momento delicado... meus agradecimentos.

Aos meus colegas de laboratório e sala de aula pelo agradável convívio diário, em especial: **Constanza**, por me guiar nos primeiros passos pela Biologia Molecular; **Aldaíres**, pela prestatividade; **Paula**, **Carolinne** e **Judas Tadeu** pela amizade sincera, apoio e conversas. **Rayana**, pelo auxílio no laboratório, pela boa companhia e pelo apoio nos meus maus momentos!

À minha amiga e co-orientadora **Nathalie** por todo apoio, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e não me deixar desistir!

Aos **meus amigos**, que por diversas vezes reclamaram a minha ausência, obrigada pela compreensão! Ao **Clayson** pelos inúmeros artigos!

Às **pacientes** que gentilmente tornaram esta pesquisa possível.

Ao professor **Dr. Cláudio Carlos da Silva**, pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pela paciência.

À professora **Dra. Daniela de Melo e Silva**, pela disponibilidade em ajudar e pela prestatividade!

À professora **Dra. Katia Karina** pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pela paciência, confiança e dedicação. Obrigada pela orientação e estímulo! A você toda minha admiração e gratidão!

Enfim, impossível citar todos que me são importantes e que, direta ou indiretamente, merecem meus sinceros agradecimentos!

A todos, muito obrigada!!!

## SUMÁRIO

FIGURAS .....	viii
TABELAS .....	ix
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Endometriose .....	16
1.1.1 Definição de Endometriose .....	16
1.1.2 Fisiopatologia .....	17
1.1.3 Sintomatologia .....	19
1.1.4 Epidemiologia .....	19
1.1.5 Caracterizações Morfológicas e Classificação .....	20
1.1.6 Atividade Física .....	22
1.1.7 Idade .....	22
1.1.8 Etnia .....	23
1.1.9 Fumo .....	23
1.1.10 Histórico Familiar .....	23
1.1.11 Infertilidade .....	24
1.1.12 Aspectos Genéticos da Endometriose .....	25
1.2 Biotransformação de Xenobióticos .....	26
1.2.1 Fases da Biotransformação .....	28
1.2.2 Citocromos P450 .....	29
1.2.3 Polimorfismo genético no gene <i>CYP1A1</i> .....	33
1.3 O gene TP53 (Tumor Protein 53) .....	34
1.3.1 O polimorfismo Arg/Pro do códon 72 do gene TP53 .....	35
1.3.2 A proteína p53 .....	37
1.3.3 A p53 e o controle do ciclo celular e da apoptose .....	39
1.3.3.1 O ciclo celular .....	39
1.3.3.2 p53 e o bloqueio do ciclo celular .....	40
2. JUSTIFICATIVA .....	42
3. OBJETIVOS .....	43



3.1 Objetivo geral .....	43
3.2 Objetivos específicos .....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
4.1 Casuística .....	44
4.2 Extração de DNA genômico .....	44
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para genotipagem do gene <i>TP53</i> .....	44
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene <i>CYP1A1</i> .....	47
4.5 Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) .....	48
4.6 Análise dos resultados .....	49
5. RESULTADOS .....	50
6. DISCUSSÃO .....	57
7. CONCLUSÃO .....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXOS .....	86

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais locais da endometriose dentro da pelve e do abdômen. Fonte: Figura modificada de Olive e Pritts, 2001 .....	20
<b>Figura 2.</b> Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009 .....	23
<b>Figura 3.</b> Lesão branca com pontos de sangramento. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009 .....	23
<b>Figura 4.</b> Lesão negra, azulada ou arroxeadada, pregueada, associada a uma cicatrização em forma de estrela decorrente de sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009 .....	24

## TABELAS

<b>Tabela I.</b> Citocromos P450 em humanos e suas principais funções .....	31
<b>Tabela II:</b> Sequência dos <i>primers</i> analisados nas amostras de DNA .....	45
<b>Tabela III:</b> Protocolo de Termociclagem para amplificação do <i>primer</i> p53ARG .....	45
<b>Tabela IV:</b> Protocolo de Termociclagem para amplificação do <i>primer</i> p53PRO .....	46
<b>Tabela V:</b> Protocolo para a amplificação de p53ARG .....	46
<b>Tabela VI:</b> Protocolo para a amplificação de p53PRO .....	46
<b>Tabela VII:</b> Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> <i>CYP1A1</i> .....	47
<b>Tabela VIII:</b> Protocolo de Termociclagem para amplificação dos <i>primers</i> <i>CYP1A1</i> ..	47
<b>Tabela IX:</b> Protocolo para a amplificação do gene <i>CYP1A1</i> .....	47
<b>Tabela X:</b> Reagentes utilizados no processo de restrição enzimática e as concentrações utilizadas .....	48
<b>Tabela XI:</b> Sequência de clivagem e tamanho dos fragmentos esperados .....	49
<b>Tabela XII:</b> Frequência dos genótipos w1/w1, w1/m1+m1/m1 do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os grupos endometriose e controle .....	50
<b>Tabela XIII:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> entre os Graus I/II e III/IV no grupo endometriose .....	51
<b>Tabela XIV:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> entre as pacientes férteis e inférteis no grupo endometriose .....	51
<b>Tabela XV:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> entre pacientes que fazem ou não atividade física no grupo endometriose .....	52
<b>Tabela XVI:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> na correlação múltipla entre o uso de anticoncepcional, ou não, o polimorfismo do gene <i>CYP1A1m1</i> e a endometriose.....	52
<b>Tabela XVII:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> quanto ao etilismo ou não no grupo endometriose .....	53
<b>Tabela XVIII:</b> Distribuição genotípica do <i>CYP1A1m1</i> entre pacientes brancas e não brancas nos diferentes grupos estudados .....	54
<b>Tabela XIX:</b> Frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro do gene <i>TP53</i> entre os grupos endometriose e controle .....	55
<b>Tabela XX:</b> Frequência genotípica do <i>CYP1A1m1</i> entre o grupo endometriose e o grupo controle correlacionada com o gene <i>TP53</i> .....	55

<b>Tabela XXI:</b> Distribuição genotípica do gene <i>TP53</i> entre os Graus I/II e III/IV no grupo endometriose .....	56
<b>Tabela XXII:</b> Frequência genotípica do gene <i>TP53</i> entre amostras de biópsia e sangue periférico no grupo endometriose .....	56

## **SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

**A** – adenina

**a.C.** – Antes de Cristo

**AHH** - aril hidrocarboneto hidroxilase

**AhR** - receptor aril hidrocarboneto

**Arg/Arg** – homozigoto para variante arginina

**Arg/Pro** – heterozigoto (arginina e prolina)

**ATP** - adenosina trifosfato

**ATPase** - enzima que catalisa a hidrólise do ATP

**Bcl – 2** – *B-cell CLL/lymphoma 2*

**C** – citosina

**CDK** - Quinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*)

**CDKI** – Inibidores de quinase dependente de ciclina (*cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*)

**cm** - centímetro

**CYP** - citocromo P450

**CYP1A1** - citocromo P450, família 1, subfamília A, forma individual 1

**CYP1A1m1 ou CYP1A1\*2A**- polimorfismo m1 do gene CYP1A1

**CYP1B1** - citocromo P450, família 1, subfamília B, forma individual 1

**CYP2** - citocromo P450, família 2

**d.C.** – depois de Cristo

**DNA** - ácido desoxirribonucléico

**dNTP** - desoxirribonucleotídeo fosfatado

**DP** - desvio padrão

**E2F** - fator de transcrição (fator de alongamento 2)

**F** - forward

**FAD** - flavina adenina dinucleotídeo

**FMN** - flavina mononucleotídio

**G** – guanina

**GADD45** – Gene que induz a correção de lesão do DNA (*growth arrest and DNA damage-inducible gene*)

**GO** - Goiás

**GST** - glutathiona S-transferase

**GSTM1** - glutathiona S-transferase Mu 1

**GSTT1** - glutathiona S-transferase Teta 1

**HAPs** - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

**H<sub>2</sub>O** - água

**IC** - intervalo de confiança

**IL -1** Interleucina 1

**m1/m1** - homozigoto mutante

**Max** - máximo

**MgCl<sub>2</sub>** - cloreto de magnésio

**Min** - mínimo

**mL** - mililitro

**mM** - milimolar

**NADH** - nicotinamida adenina dinucleotídio com presença do hidrogênio

**NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

**NAT** - N-acetiltransferase

**ng** - nanograma

**nm** - nanômetro

**OR** - Odds ratio

**pb** - par de bases

**PCNA** – antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferative Nuclear Cell Antigen*)

**p53** - proteína 53

**R** - reverse

**RNA** - ácido ribonucléico

**T** - timina

**Taq** - *Thermus aquaticus*

**TNF** - fator de necrose tumoral

**TP53** - gene supressor de tumor p53

**U** - unidade

**V** – volt

**x** – vezes

**WAF1** - fragmento 1 ativador de p53 do tipo selvagem (*Wild-type p53-Activated Fragment*)

**w1/w1** - homozigoto selvagem

**w1/m1** - heterozigoto

+/- - mais ou menos

% - por cento

**µg** - micrograma

° C - grau Celsius

∞ - infinito

[ ] - concentração

**µL** - microlitro

**χ<sup>2</sup>** - qui-quadrado

## RESUMO

A endometriose é uma patologia ginecológica benigna dependente de estrógeno que afeta mulheres na idade reprodutiva. É caracterizada pela presença de tecido semelhante ao endométrio fora do útero, que induz uma reação crônica e inflamatória, denominada de tecido ectópico. A endometriose apresenta quatro estágios: forma mínima (estágio I), leve (estágio II), moderada (estágio III) e severa (estágio IV). A sintomatologia é variada e inclui dor pélvica e infertilidade. A etiologia permanece incerta e diversos são os estudos com o intuito de desvendar as associações entre a endometriose e o polimorfismo de certos genes, como o *CYP11A1m1* e o *TP53*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a possível correlação entre a endometriose e os polimorfismos dos genes *CYP11A1m1* e *TP53*. O grupo caso foi composto por 21 mulheres diagnosticadas com endometriose cujas amostras eram biópsia de endométrio. O grupo controle foi composto por amostras de sangue periférico de 42 mulheres sem queixas relacionadas à patologia. Os genótipos foram determinados pelas técnicas de PCR e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). A frequência do genótipo homocigoto selvagem w1/w1 em pacientes com endometriose (n=21) foi de 57% e 43% para os genótipos w1/m1+m1/m1. No grupo controle essas frequências foram de 86% para o genótipo w1/w1 e 14% para os w1/m1+m1/m1. O teste de Fischer indicou que a associação entre a patologia e o alelo mutante m1 é estatisticamente significativa (p=0,01). O resultado está de acordo com outros estudos que relatam que a presença do genótipo w1/w1 diminui a incidência da doença. Quanto ao polimorfismo do gene *TP53*, no grupo endometriose, a frequência dos genótipos Arg/Arg foram de 38%; Arg/Pro 52% e Pro/Pro 10%. No grupo controle as frequências observadas foram 57% para Arg/Arg; 43% para Arg/Pro e 0% para Pro/Pro. O teste do  $\chi^2$  não mostrou significância no resultado (p=0,07). Foi avaliada a variação genotípica entre as amostras de sangue periférico e biópsia de endométrio quanto ao gene *TP53*. A diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,50). O alelo mutante m1 do gene *CYP11A1m1* é um possível gene candidato para a avaliação de pacientes com endometriose, independente do grau de severidade.

**Palavras chave:** endometriose, polimorfismo, *CYP11A1m1*, *TP53*.



## ABSTRACT

Endometriosis is a benign gynecological disease estrogen dependent that affects women at reproductive age. It is characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity designated as ectopic endometrium, involving chronic inflammation in the pelvic cavity. The four stages of endometriosis are classified as: minimal (stage I), mild (stage II), moderate (stage III) or severe (stage IV). Symptomatology of endometriosis may vary and includes chronic pelvic pain and infertility. The etiology of endometriosis is uncertain and many studies are focusing on the associations between endometriosis and polymorphic mutations of several genes, such as *CYP11A1m1* and *TP53* genes. The aim of the present study was to evaluate the possible correlation between endometriosis and polymorphisms of *CYP11A1m1* and *TP53* genes. The study group consisted of 21 women diagnosed with endometriosis which endometrial biopsies were collected as samples. The control group included samples of peripheral blood of 42 women without symptoms related to the disease. Genotypes were determined by PCR and RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) assays. The frequency of homozygote wild genotype w1/w1 in patients diagnosed with endometriosis (n=21) was 57% and 43% for w1/m1+m1/m1 genotypes. In the control group the frequencies were 86% for w1/w1 genotype and 14% for w1/m1+m1/m1 genotype. Fisher's test demonstrated that the association between the disease and the m1 mutant allele was statistically significant (p=0,01). The result is consistent with other studies reporting that the presence of genotype w1/w1 decreases the incidence of the disease. As for the *TP53* polymorphism in the endometriosis group, the frequency of genotype Arg/Arg was 38%, 52% for Arg/Pro and 10% for Pro/Pro genotypes. In the control group the frequencies observed were 57% for the Arg/Arg; 43% for Arg/Pro and 0% for Pro/Pro. The  $\chi^2$  test showed no significant difference in the result (p=0,07). Genotype variation among the samples of peripheral blood and endometrial biopsy on the *TP53* gene was evaluated. The difference was not statistically significant (p=0,50). The m1 mutant allele of the gene *CYP11A1m1* is a possible candidate molecular marker for endometriosis, regardless severity.

**Key words:** endometriosis, polymorphism, *CYP11A1m1*, *TP53*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Endometriose

### 1.1.1 Definição de Endometriose

A endometriose é uma patologia inflamatória crônica dolorosa, que representa um dos transtornos ginecológicos benignos mais comuns. Desenvolve-se em mulheres na idade reprodutiva e regride espontaneamente após a menopausa (Johnson *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2006; Renner *et al.*, 2006). Este fato indica que a patologia é dependente de estrógeno (Montgomery *et al.*, 2008). Existem três formas diferentes da doença (1) endometriose retovaginal, (2) endometriose ovariana cística e (3) endometriose peritoneal. Cada uma apresenta singularidades quanto à patogenia, sintomatologia, história natural da doença e tratamento (Dunselman *et al.*, 2001).

A primeira descrição dos sintomas característicos da endometriose, bem como o tratamento para as alterações menstruais provocadas pela doença, data de 1600 a.C. pelo Papiro Egípcio de Ebers (Nakata *et al.*, 2004). No ano de 1835 d.C. Cruveilhier fez referência a lesões císticas de anexos, útero e vagina (Baranova *et al.*, 1987).

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometrial, com características glandulares e/ou estromais idênticas aos da cavidade uterina, fora do útero, principalmente no peritônio pélvico e ovários. É conceituada, de acordo com a orientação da *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE), como uma enfermidade que apresenta tecido semelhante ao endométrio fora do útero, induzindo uma reação crônica e inflamatória. A presença de endométrio fora da cavidade uterina acarreta processos inflamatórios, reação cicatricial e formação de aderências que são associados à infertilidade e à dor pélvica crônica (Giordano, 1998; Cramer e Missner, 2002; Giudice e Kao, 2004). Histologicamente é descrita como tecido extra-uterino com características semelhantes ao do endométrio tópico (Kamergorodsky, 2007; Riachi, 2008).

A presença de glândulas e estroma endometrial fora da cavidade uterina é denominada de tecido ectópico que responde a hormônios e drogas de forma similar ao endométrio localizado no útero, denominado de tecido eutópico. É uma doença estrógeno dependente e o hormônio auxilia a manutenção dos implantes ectópicos (Dentillo, 2007). Assim, o tecido ectópico está sujeito às alterações que acontecem durante o ciclo sexual feminino, de modo que essas lesões endometrióticas apresentam

sangramento que parece favorecer o desencadeamento de reação imunológica local, inflamação e formação de adesões fibróticas, que podem ser responsáveis pelos sintomas (Arya e Sahw, 2005).

### **1.1.2 Fisiopatologia**

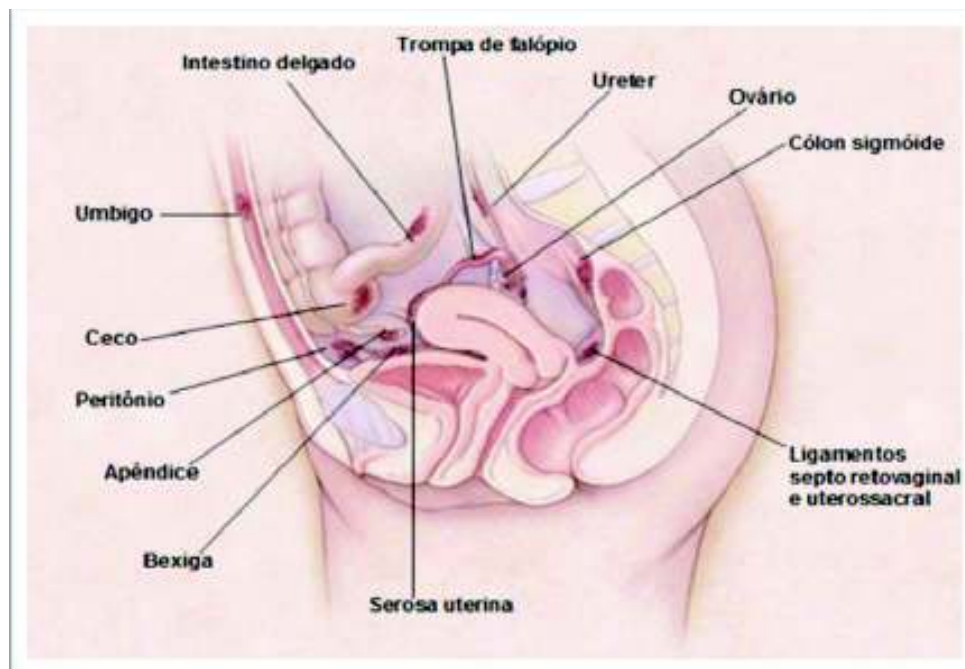
A endometriose é uma doença com forte componente genético (Tempfer *et al.*, 2009) e sua etiopatogenia é complexa e multifatorial envolvendo fatores ambientais, anatômicos, endócrinos e alterações imunológicas. É uma patologia que gera muitas incertezas quanto a sua etiologia, na medida em que existem diferentes teorias, embora nenhuma delas permita explicar todos os casos e todas as localizações (Halme *et al.*, 1984; Cramer e Missner, 2002; Giudice e Kao, 2004).

A história e exames clínicos podem sugerir o diagnóstico presuntivo de endometriose. Porém, o definitivo é cirúrgico pela de laparoscopia ou laparotomia. A laparoscopia é onerosa e invasiva, no entanto é o método mais confiável e tido como padrão “ouro” (Araújo, 2011). Os implantes endometrióticos são encontrados, mais comumente na cavidade pélvica, nos ovários e septo reto-vaginal. No entanto, a doença pode afetar vários órgãos como pericárdio, tecido subcutâneo, pulmões, musculatura diafragmática, fígado, baço, intestinos, rim, dentre outros. Por este motivo é denominada atualmente de multissistêmica (Lebovic *et al.*, 2001; Giudice e Kao, 2004). A figura 1 apresenta os principais locais da endometriose dentro da pelve e do abdômen.

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

A fisiopatologia da doença ainda é desconhecida e as teorias mais comuns são (1) menstruação retrógrada com implantação subsequente; (2) metaplasia celômica e (3) transporte hematogênico ou linfático de tecido endometrial (Santanam *et al.*, 2002; Araujo, 2011). Sampson propôs, em 1927, a teoria da menstruação retrógrada. De acordo com esta as células endometriais com capacidade de proliferação e implantação refluiriam pelas tubas uterinas e se alojariam, principalmente, na superfície dos ovários e no peritônio pélvico. Esse fato foi comprovado por estudos que permitiram a

visualização do refluxo menstrual por videolaparoscopia em mais de 90% das mulheres (Marino, 2006).



**Figura 1.** Principais locais da endometriose dentro da pelve e do abdômen.

Fonte: Figura modificada de Olive e Pritts, 2001.

Posteriormente, avaliou-se que esse processo era quase universal entre as mulheres e somente algumas desenvolviam endometriose. Pesquisadores cogitaram então a existência de fatores imunológicos na etiopatogenia da doença (Nothnick, 2001). A endometriose ocorreria devido a uma alteração da resposta imunológica ao tecido endometrial refluído pelas trompas, como uma explicação para a origem e a manutenção da lesão endometrial (Lebovic *et al.*, 2001). Os estudos para a avaliação das funções imunológicas em pacientes com a doença são diversos (Marino, 2006).

A metaplasia celômica foi uma teoria descrita por Meyer, em 1919, em que células do epitélio celômico (tecido do qual derivam a mucosa de quase todo o trato genital e o epitélio germinativo) transformar-se-iam, por metaplasia (alteração reversível em que um tipo celular adulto – epitelial ou mesenquimal – é substituído por outro tipo celular adulto), em células endometriais em sítios estranhos à cavidade uterina. Isto explicaria a presença de implantes endometrióticos em locais longe da pelve como pulmões, fígado, dentre outros (Witz, 2002).

As diversas teorias reforçam a ideia de que a endometriose é complexa e multifatorial, e que a suscetibilidade em apenas algumas mulheres é devida a (1) maior exposição a resíduos menstruais, (2) ao endométrio eutópico anormal, (3) ao ambiente peritoneal alterado, (4) ao aumento da capacidade angiogênica, (5) à atividade inflamatória, (6) à expressão aumentada de moléculas de adesão e (7) apoptose reduzida (Treolar *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Ulukus *et al.*, 2009).

### **1.1.3 Sintomatologia**

Os sintomas são altamente variáveis e existem mulheres assintomáticas que descobrem a doença quando se submetem a investigações para a infertilidade. Pacientes podem apresentar dismenorréia (popularmente conhecida como cólica menstrual), dor pélvica crônica, dispareunia (dor genital durante o ato sexual), infertilidade (incapacidade temporária ou permanente de gerar um filho ou de levar uma gravidez até seu termo natural), menorragia (sangramento excessivo e/ou prolongado durante o período menstrual) e metrorragia (hemorragia uterina em qualquer outro momento que não a menstruação). Outros sintomas podem estar relacionados à doença como dor durante a ovulação e fadiga crônica (Jackson e Telner, 2006).

A endometriose pode ter comportamento diferente do esperado quanto à sintomatologia clínica. Pacientes diagnosticadas laparoscopicamente com endometriose mínima apresentam sintomas exacerbados em relação às manifestações de dor e/ou infertilidade. Não é infrequente o diagnóstico ocasional de pacientes em graus mais avançados da doença e que são completamente assintomáticas quanto aos sintomas clínicos e à possibilidade de gravidez (Bedone, 1994).

### **1.1.4 Epidemiologia**

A epidemiologia da endometriose apresenta dados conflitantes. Porém, acredita-se que o estresse, e a conseqüente ação do sistema imunológico, a menarca precoce, a diminuição da paridade e a postergação da primeira gestação estejam envolvidos com o aparecimento da doença (Ribeiro Júnior, 2009).

A exata incidência da doença é desconhecida e complexa de ser determinada devido à variabilidade dos sintomas e à definição diagnóstica, que necessita de

abordagem cirúrgica. No entanto, estima-se que 18% das mulheres em idade reprodutiva são afetadas e, a maioria exprime sintomas debilitantes (Prowse *et al.*, 2005).

Aproximadamente, em 4% dos casos há queixa de disúria (sensação de dificuldade, dor ou “queimação” ao urinar) devido ao envolvimento da bexiga. Outras pacientes podem ser assintomáticas (Dentillo, 2007). Entretanto, quando consideradas somente as pacientes com dor pélvica e com infertilidade, a incidência de endometriose aumenta para 87% (Ozawa, 2006).

### **1.1.5 Características morfológicas e Classificação**

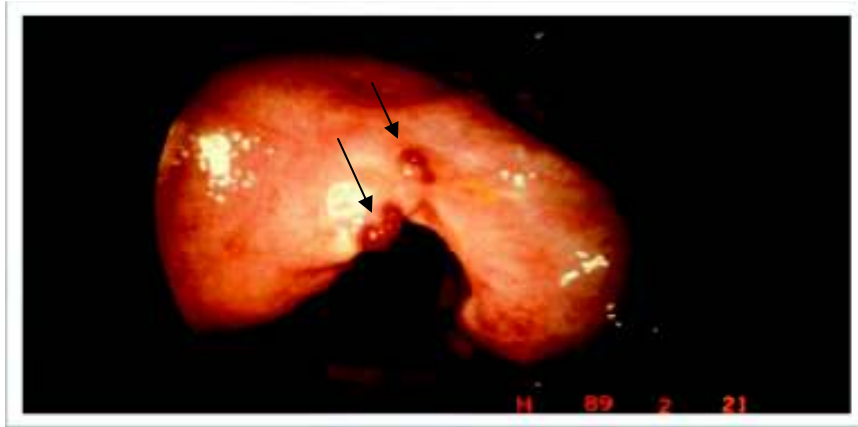
A classificação da endometriose foi organizada e proposta pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*American Society for Reproductive Medicine* - 1997) e apresenta quatro estágios: forma mínima (estágio I), leve (estágio II), moderada (estágio III) e severa (estágio IV).

Quanto à morfologia, ainda de acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (1997), os implantes podem ser variáveis em relação às formas e às colorações. Os implantes endometrióticos são semelhantes a pequenas manchas planas ou bolhas sobre a superfície pélvica. As lesões podem ser claras, brancas, vermelhas, marrons, azuis ou pretas. A severidade e o curso da doença são imprevisíveis, pois depende de fatores como a quantidade de implantes, se há ou não invasão do peritônio.

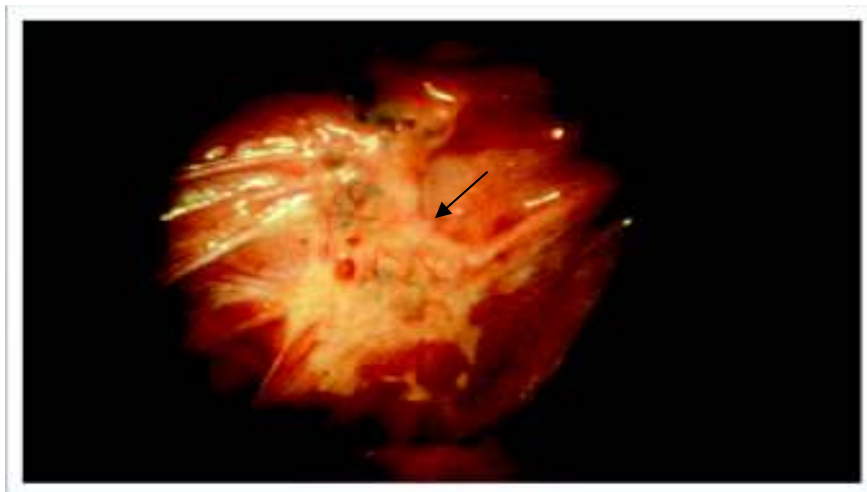
As lesões vermelhas são mais agressivas, ativas, elevadas e histologicamente semelhantes ao epitélio eutópico proliferativo. Correspondem ao estágio I e acredita-se que sejam mais vascularizadas e com maior poder invasivo. As lesões negras correspondem ao estágio mais avançado da endometriose e também são ativas. Já as lesões brancas são inativas e menos vascularizadas. Apresentam um aspecto cicatricial e surgem após as lesões negras (Meola, 2008). As figuras 2, 3 e 4 apresentam algumas lesões com suas variações de forma e coloração por laparoscopia.

Quando os cistos endometrióticos estão presentes no interior do ovário recebem a denominação de endometriomas ou “cistos de chocolate”. A coloração marrom é devido ao sangue que escurece com o passar do tempo. Os endometriomas se comportam de maneira diferente que a endometriose em outros tecidos devido à alta

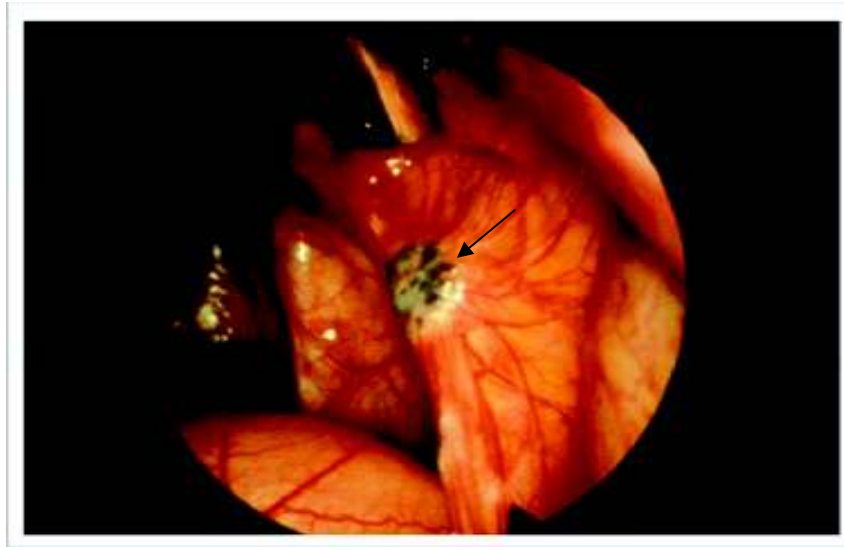
concentração de hormônios e fatores de crescimento presentes no interior do ovário (Ribeiro Júnior, 2009).



**Figura 2.** Agrupamento de endometriose vermelha no corno tubário. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.



**Figura 3.** Lesão branca com pontos de sangramento. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.



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

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009.

### 1.1.6 Atividade Física

A atividade física regular teria um efeito protetor em mulheres que a praticam por reduzir os níveis de estrogênio, dessa forma as mulheres apresentariam um risco significativamente menor de endometriose em cerca de 70%, devido à melhora da imunidade. No entanto, esses efeitos dependem da época de início e da frequência com que a atividade é desempenhada (Cramer *et al.*, 1986; Dhillon e Holt, 2003).

### 1.1.7 Idade

A doença é estrogênio dependente, portanto está relacionada ao período reprodutivo da mulher. Raramente a doença é identificada após esse período. Cerca de 2 a 5% das mulheres pós-menopausa são afetadas (Moen *et al.*, 1997; Manero *et al.*, 2009). Não foram encontrados estudos que indiquem a relação entre idade e gravidade da doença. Até a idade de 35 anos a taxa clínica de incidência apresenta uma ascendência acentuada e, após 44 anos a taxa cai consideravelmente (Mangtani e Booth, 1993).



### **1.1.8 Etnia**

Existem controvérsias quanto à relação entre a endometriose e a etnia. Um estudo mostrou que na raça amarela a endometriose é mais prevalente enquanto que na raça negra é de rara incidência (Mangtani e Booth, 1993). Outra pesquisa relatou que a incidência da patologia é 40% mais baixa em mulheres afro-americanas ou hispânicas do que em mulheres caucasianas. Quando comparadas mulheres caucasianas com asiáticas a mesma relação não foi encontrada. Argumenta-se que a incidência da doença em mulheres afro-americanas não é legítima, devido à deficiência do acesso aos cuidados com a saúde. Além disso, acredita-se que os diagnósticos sejam mal estabelecidos e que elas sejam classificadas como portadoras de doença inflamatória pélvica e não endometriose (Missmer *et al.*, 2004).

### **1.1.9 Fumo**

Mulheres que possuem o hábito de fumar e consomem mais de 20 cigarros por dia apresentam níveis de estrogênio circulante menor que as não fumantes. Conseqüentemente, apresentam menor incidência da doença (Cramer *et al.*, 1986; Hediger *et al.*, 2005). Este resultado não foi obtido na pesquisa de Parazzini e colaboradores (1989) que não encontraram diferença estatisticamente significativa entre fumantes e não fumantes e a incidência da doença.

### **1.1.10 Histórico familiar**

A associação entre genética e o crescimento de tecido endometrial ectópico foi baseada em estudos familiares, que evidenciaram a maior incidência da doença em parentes de primeiro grau de mulheres afetadas (de 4,3 a 6,9%) em relação a parentes de mulheres não afetadas (de 0,6 a 2,0%) (Moen e Magnus, 1993; Simpson e Bischoff, 2002; Stefansson *et al.*, 2002). Acredita-se que ela seja herdada de modo poligênico/multifatorial, ou seja, o fenótipo é determinado pela combinação de múltiplos genes e fatores ambientais (Velebil *et al.*, 1995; Fraser, 2008). Quando a doença ocorre familiarmente tende a ser mais severa se comparada aos casos esporádicos (Kennedy *et al.*, 1996; Attar *et al.*, 2010; Nouri *et al.*, 2010). Existem

estudos sobre influência genética em gêmeas que demonstraram o aumento da concordância em gêmeas monozigóticas quando comparado com gêmeas dizigóticas com herança de 51% (Treloar *et al.*, 1999).

### **1.1.11 Infertilidade**

As questões fisiopatológicas e terapêuticas a respeito da associação entre endometriose e infertilidade permanecem obscuras e a relação é controversa. No entanto, vários dados evidenciaram a diminuição de fecundidade (Castelli, 2008; Dib, 2010). A literatura relata que 25 a 50% das mulheres inférteis apresentam a doença e que 30 a 50% das mulheres afetadas são inférteis (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004).

Um estudo foi desenvolvido em longo prazo com 28 mulheres, que obtiveram o diagnóstico de endometriose na adolescência, comparando as formas graves e leves de endometriose e sua fecundabilidade. A população amostral é relativamente pequena, mas corrobora para fatos observados na população em geral, que há uma relação inversa entre a progressão da doença e a fecundabilidade (Ventolini *et al.*, 2005).

Alguns mecanismos têm sido propostos com o intuito de esclarecer a associação entre a endometriose e infertilidade como (1) distorção da anatomia pélvica causada por adesões endometrióticas que podem prejudicar a liberação do óócito ou inibir seu transporte; (2) alteração da função peritoneal em pacientes com a doença devido ao aumento do volume do fluido peritoneal, ao aumento da concentração de macrófagos ativados, prostaglandinas, interleucina 1 (IL-1), TNF (*tumor necrosis factor*) e proteases. Essas alterações causariam efeitos adversos no óócito, no espermatozoide e no embrião; (3) falha de implantação causada pela redução da expressão endometrial durante a fase de implantação (Meola, 2008).

As alterações anatômicas existentes em mulheres com endometriose em estágio mais avançado, como obstrução tubária e aderências entre as estruturas pélvicas, podem explicar a relação entre endometriose e infertilidade, pois há comprometimento da postura ovular, da captação do óócito e/ou transporte do embrião. Já os mecanismos pelos quais a endometriose causa infertilidade em pacientes que não possuem modificações anatômicas significativas ainda não são bem conhecidos (Ribeiro Júnior, 2009).

### 1.1.12 Aspectos genéticos da endometriose

Diversos aspectos do sistema reprodutivo feminino são influenciados e muitos são os estudos que têm conseguido identificar genes suscetíveis para desordens na fertilidade feminina como ocorre na síndrome do ovário policístico, na endometriose, no câncer (ovário, vulva, cervical), na falha ovariana prematura, no aborto recorrente e na pré-eclampsia (Levanat *et al.*, 2004; Modugno, 2004; Ferreira *et al.*, 2006).

O polimorfismo genético é caracterizado pela presença de diferentes versões de uma sequência de DNA (alelos), em um determinado local do cromossomo (lócus) e apresenta uma frequência superior a 1% nos cromossomos da população em geral. Já a mutação faz referência a qualquer mudança permanente na sequência de nucleotídeos ou DNA e sua frequência na população é inferior a 1% (Willard, 2002).

A endometriose é alvo de diversos estudos e com os avanços da biologia molecular é possível aprofundar-se nas pesquisas sobre a expressão, regulação e herança de genes na endometriose. Diversas são as pesquisas que têm sido realizadas com o intuito de estabelecer a associação entre a doença e genes candidatos, como genes envolvidos na inflamação, na síntese de esteroide, na desintoxicação, no metabolismo de estrógeno, na apoptose, na regulação do ciclo celular, além de fatores de crescimento, moléculas de adesão, receptores de hormônios, oncogenes e sistemas metabólicos (Hansen e Eyster, 2010). Vários dados da literatura médica favorecem a existência de uma associação entre as variantes polimórficas, em diversos genes, e a endometriose (Falconer *et al.*, 2007; Hansen e Eyster, 2010). Alguns estudos populacionais demonstraram que mulheres com endometriose apresentam risco estatisticamente significativo de desenvolver vários tipos de câncer (Brinton *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 2006).

Diversos genes envolvidos na detoxificação de xenobióticos têm sido estudados quanto à sua relação com a endometriose, pois a exposição ambiental, principalmente a dioxina, parece estar envolvida na etiologia da doença (Hadfield *et al.*, 2001; Arvanitis *et al.*, 2003; Falconer *et al.*, 2007; Montgomery *et al.*, 2008). As enzimas CYPs estão envolvidas na fase I do processo de biotransformação e a mais estudada é a CYP1A1. O polimorfismo de restrição MspI é resultado da transição de uma timina para uma citosina (T → C) e promove o aumento da sua expressão (Arvanitis *et al.*, 2001). As

variantes genéticas na regulação, expressão e atividade dos genes de fases I e II podem influenciar a suscetibilidade a certos tipos de doenças (Rossit *et al.*, 2000).

Um fato que auxilia na explicação da persistência das lesões endometrióticas fora da cavidade uterina é a resistência à apoptose, causada pela desregulação de moléculas pró-apoptóticas menos expressas, como a proteína p53, e moléculas anti-apoptóticas mais expressas, como Bcl-2 (Dentillo, 2007). Estudos sugerem que há uma baixa suscetibilidade à endometriose quando a arginina está presente em homozigose no gene *TP53* (Arg/Arg). Já quando a prolina está presente, seja em homozigose ou heterozigose, existe maior suscetibilidade ao desenvolvimento da endometriose. Outros ainda demonstraram que o alelo prolina (homozigose ou heterozigose) estava presente nas formas mais severas da doença, enquanto outros não demonstraram associação e sugeriram fatores ambientais e vários genes estavam relacionados com a doença (Ribeiro Júnior, 2009).

## **1.2. Biotransformação de Xenobióticos**

Os indivíduos estão expostos diariamente a uma variedade de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) que podem ser absorvido pelos pulmões, pela pele ou por ingestão. São de origem natural ou sintética e incluem fármacos, aditivos alimentares, pesticidas, toxinas, substâncias químicas de uso industrial e poluentes ambientais. Podem tanto ser inofensivos quanto provocarem respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica. (Sipes & Gandolfi, 1991; Parkinson, 2001; Franco e Franco, 2003).

A eliminação desses compostos ocorre pela urina, bile, fezes, ar expirado e transpiração e, quando não são voláteis, sua eliminação depende da solubilidade da molécula em meio aquoso. Portanto, xenobióticos mais hidrossolúveis podem ser eliminados de forma inalterada. No entanto, moléculas lipofílicas dependem essencialmente de processos de biotransformação para que possam ser eliminadas, visto que tendem a permanecer e se acumular no organismo já que os meios usuais de eliminação (urina e fezes) são aquosos. Então esses compostos lipofílicos são transformados físico-quimicamente e adquirem características hidrofílicas com o intuito de facilitar sua excreção. Caso contrário a acumulação causaria danos ao material genético e poderia comprometer o organismo. De modo geral, a modificação química

dos xenobióticos lipofílicos facilita a sua eliminação e por esse fato a biotransformação é considerada um processo de desintoxicação (Kalant, 1991; Rocha, 2004).

A biotransformação é a mudança química pela qual o xenobiótico é submetido no organismo, por reações químicas, sob a ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas (Meyer, 1996). O processo de metabolização de compostos xenobióticos representa um mecanismo de proteção das células (Hayes e Pulford, 1995). Essas enzimas atuam nas diferentes fases do processo bioquímico e são determinadas geneticamente (Korolkovas e Burckhalter, 1988; Nora e Fraser, 1985; Lehninger *et al.*, 1995). São encontradas em praticamente todos os órgãos, como rins, pulmões, pele, cérebro, intestino delgado, coração, testículos e placenta, mas suas atividades se concentram, principalmente, no fígado. (Watkins, 1992). Podem ainda ser encontradas no retículo endoplasmático (microsomas), na fração solúvel do citoplasma (citosol) e, em pequenas quantidades na mitocôndria, no núcleo e nos lisossomos (Rocha, 2004).

O efeito biológico do xenobiótico também pode ser alterado no processo de biotransformação (Vermeulen, 1996; Parkinson, 2001). Diversos são os fármacos que inicialmente precisam ser biotransformados para que possam exercer seu efeito terapêutico, assim como alguns xenobióticos apresentam efeitos tóxicos somente após o processo de transformação. Esse processo pode ainda gerar metabólitos intermediários muito reativos que podem se ligar a proteínas e ácidos nucleicos causando citotoxicidade e genotoxicidade, ao contrário das moléculas às quais o organismo foi inicialmente exposto (Omura, 1999). No entanto, em sua maioria, a biotransformação resulta na diminuição do efeito terapêutico ou do efeito tóxico dos xenobióticos (Rocha, 2004).

A velocidade da reação depende da concentração de citocromo P450, da proporção das isoformas, da afinidade pelo substrato e da competição entre substratos endógenos e exógenos. A velocidade também é afetada por outros fatores como genéticos (polimorfismos), fisiológicos (doenças, idade, sexo) e ambientais (poluentes e substâncias químicas industriais) ou pelo uso concomitante de outras drogas. Tais fatores podem promover a inibição ou a indução da velocidade de biotransformação (Franco e Franco, 2003).

### 1.2.1 Fases da Biotransformação

As reações de biotransformação catalisadas pelas enzimas podem ser agrupadas em duas fases que são sequenciais: fase I e fase II. A fase I envolve as enzimas microsossomais e inclui as reações de oxidação, redução ou de hidrólise. Essas reações introduzem ou expõem um grupo funcional quimicamente reativo (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH ou -COOH) na molécula do xenobiótico. Elas podem ativar, inativar ou inalterar as atividades de certo compostos. Tais reações que, geralmente, promovem um discreto aumento da hidrossolubilidade em relação à molécula original, fornecem os grupos funcionais que possibilitam as reações de fase II de conjugação a um composto endógeno. Os metabólitos conjugados são solúveis em água e encontrados na urina e nas fezes (Gandolfi e Sipes, 1991; Gibson e Skett, 1994; Parkinson, 2001).

As reações de fase II podem ou ser precedidas pelas reações de fase I e são caracterizadas por reações de conjugação com o intuito de inativar o produto da fase I, caso ele ainda não tenha sido inativado (Kalant, 1991). Caso o composto apresente grupos funcionais adequados a conjugação pode acontecer sem que ocorra a fase I. Em casos excepcionais, os produtos da fase II podem ser substratos para as reações catalisadas pelas enzimas de fase I. A fase II inclui glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutathione, aminoácidos e ácidos graxos (Sipes e Gandolfi, 1991; Gibson e Skett, 1994; Parkinson, 2001). Nessas reações, o metabólito oriundo da fase I ou o xenobiótico é ligado de forma covalente a uma macromolécula (exemplo: ácido glicurônico, glutathione, sulfatos inorgânicos e aminoácidos), por meio da glutathione S-transferase (GSTs) e UDP-glucuroniltransferases (NATs) que funcionam como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, gerando um conjugado hidrossolúvel passível de ser eliminado pelas vias renal e biliar (Sipes e Gandolfi, 1991; Gibson e Skett, 1994).

O sistema citocromo P450 (CYP: cy= cytochrome e P= pico de absorbância) é o sistema enzimático mais importante que participa das reações de fase I e está presente nas membranas do retículo endoplasmático ou fração microsossomal das células de diversos tecidos, principalmente fígado, rins e intestino. Algumas enzimas de conjugação (fase II) são solúveis e encontradas livres na fração citosólica. Outras também são encontradas na fração microsossomal como as UDP-glucuronosiltransferases (Gibson e Skett, 1994; Parkinson, 2001).

Das enzimas GSTs as mais estudadas são as GSTT1 e GSTM1. O gene *GSTM1* possui polimorfismo, com dois alelos funcionais ativos, que apresentam a mesma eficiência metabólica, e um alelo inativo que não é capaz de sintetizar seu produto proteico devido à grande deleção no gene. Indivíduos homozigóticos para o alelo *GSTM1* nulo são tidos como grupo de risco, principalmente se expostos a elevados níveis de carcinógenos e compostos químicos, pois apresentam defeito enzimático em seus sistema de detoxificação (Baranova et al., 1987).

### 1.2.2 Citocromos P450

Os citocromos P450 compõem uma família de hemoproteínas (apresenta o grupamento prostético heme em sua estrutura) que são encontradas em todo o reino biológico, procarioto e eucarioto, e possuem papel fundamental no processo de transformação oxidativa de moléculas endógenas e xenobióticos (Gotardo, 2006). Estão presentes na membrana do retículo endoplasmático de plantas, fungos e animais e na membrana interna das mitocôndrias de células animais (Williams *et al.*, 2000).

O sistema enzimático citocromo P450 é composto por:

- ✓ Citocromo P450: é o principal componente do sistema enzimático oxidativo. Essa denominação foi criada por Omura e Sato, no ano de 1964, e faz correspondência ao pico de absorção espectrofotométrica no comprimento de onda de 450nm pelo complexo formado com o monóxido de carbono. Todos os citocromos descritos até então apresentam como grupo prostético o heme ou ferroprotoporfirina IX sendo considerada uma hemoproteína.
- ✓ NADPH-citocromo P450 redutase ou NADPH-citocromo C redutase: enzima intermediária, flavoproteína, que contem quantidades equimolares de flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Existe ainda outro grupo enzimático, NADH-citocromo b5 redutase, que acompanha o citocromo P450 e funciona como um doador adicional de elétrons. O citocromo b5 transfere elétrons do NADH e tem como função estimular a atividade dos CYPs. As enzimas necessitam de um agente redutor, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e o oxigênio molecular. Uma molécula de oxigênio é consumida por uma molécula de substrato. Um átomo de oxigênio

aparece no produto e o outro aparece sob a forma de água (Oga *et al.*, 1988; Sipes e Gandolfi, 1991; Oga, 1996; Parkinson, 2001; Montellano, 2004).

Esse sistema enzimático está envolvido em diversos processos que são importantes alvos de estudo na medicina como: 1) inativação ou ativação de agentes terapêuticos; 2) conversão de produtos químicos em moléculas muito reativas capazes de gerar dano celular indesejado, morte ou mutações; 3) produção de hormônios esteroides; 4) metabolismo de ácidos graxos e seus derivados (Masters e Okita, 1980). Apresenta uma variedade de substratos como vitaminas, esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas e xenobióticos em geral (drogas, carcinógenos ambientais, antioxidantes, solventes, anestésicos, corantes, pesticidas, produtos derivados de petróleo, alcoóis dentre outros) (Conforti, 2004).

Klingeberg descobriu o citocromo P450 monooxigenase, no ano de 1958, em microsossomos do fígado de ratos (Omura, 1999). É uma hemeproteína que, ligada ao monóxido de carbono, produz um único pico de absorção ótica em 450nm. Tal propriedade diferencia a hemeproteína das demais proteínas conhecidas. Em 1963, descobriu-se sua função sobre as reações de oxidação de diversas drogas nos microsossomos do fígado (Estabrook, Cooper e Rosenthal, 1963).

O surgimento das formas primárias de CYP ocorreu antes mesmo da divergência entre procariotos e eucariotos e possivelmente sua função era de metabolizar compostos endógenos e não xenobióticos. As CYPs comprovadamente capazes de metabolizar xenobióticos surgiram há aproximadamente 500 milhões de anos. A teoria sugerida para o aparecimento das primeiras CYPs foi a coevolução de animais e plantas, uma pressão seletiva em prol das enzimas com propriedades de metabolização de toxinas produzidas pelas plantas, estas consumidas pelos animais (Costa, 2011).

Nos mamíferos estão presentes em todas as células, exceto nos glóbulos vermelhos maduros e nas células musculares esqueléticas, e são as principais representantes das monooxigenases (Masters e Okita, 1980). São capazes de catalisar uma diversidade de reações de oxidação de muitos compostos de estruturas diferentes como a hidroxilação de carbonos saturados, a oxidação de heteroátomos, as reações de desalquilação e oxidação de aromáticos, dentre outras. Os citocromos P450 utilizam dois elétrons (fornecidos por enzimas redox) para ativar o oxigênio molecular e transferir um único átomo de oxigênio ao substrato (Montellano, 2004; Denisov, 2005).



As diversas enzimas da família do citocromo P450 apresentam em comum a absorvância máxima de 450nm do complexo formado pelo heme em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e o monóxido de carbono (Omura e Sato, 1964). Quanto à nomenclatura, as enzimas CYP estão agrupadas em família, subfamília e isoforma de acordo com as semelhanças sequenciais, com a homologia dos genes correspondentes. Dessa forma, o número arábico após o prefixo CYP é designado para a família e a letra a seguir indica a subfamília (exemplo: CYP1A). O número seguinte indica a isoenzima específica (CYP1A1). Esse sistema de nomenclatura é utilizado universalmente. A sequência de proteínas entre membros de uma mesma família apresenta homologia de 40%, enquanto que numa subfamília a identidade é de 55% (Nebert *et al.*, 1991; Scott, 1999).

De uma forma geral, as enzimas citocromo P450 microsossomais hepáticas de cada família pertencem a uma única subfamília. A exceção é a família CYP2 que contém 5 subfamílias (CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D e CYP2E). Em humanos, são conhecidas até o momento 57 isoformas de P450 e em 12 as funções são desconhecidas, 15 são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e as demais atuam no metabolismo de compostos endógenos. A maioria dos xenobióticos é metabolizada pelos genes das famílias *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* e os mais importantes na produção de metabólitos secundários capazes de induzir dano ao DNA são *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2E1* e *CYP3A4*. A tabela 1 apresenta os diversos citocromos e suas principais funções (Nelson *et al.*, 2004; Seliskar, Rozman, 2007; Costa, 2011).

**Tabela 1.** Citocromos P450 em humanos e suas principais funções

Citocromos P450	Principal função
CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYPAC19, CYP3D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7	Metabolismo de xenobióticos
CYP2A7, CYP2S1, CYP2W1, CYP3A43, CYP4A22, CYP4F11, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1, CYP20, CYP27C1	Funções desconhecidas
CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP19, CYP21A2	Síntese do hormônio esteróide

CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP27A1, CYP39	Síntese da bile
CYP46, CYP51	Biosíntese do colesterol
CYP1B1	Metabolismo do andrógeno, metabolismo do ácido retinóico
CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1	Metabolismo do ácido retinóico
CYP2R1	Hidroxilação do carbono 25 (C-25) da vitamina D3
CYP24	Hidroxilação do carbono 24 (C-24) da 1,25-diidroxi-vitamina D3
CYP27B1	Hidroxilação do carbono 24 (C-24) da 25-hidroxi-vitamina D3
CYP4A11, CYP4B1	Hidroxilação de ácido graxo saturado
CYP2U1	Hidroxilação de cadeia longa de ácido graxo
CYP2J2	Epoxidação do ácido araquidônico
CYP5A1	Síntese do tromboxano
CYP4F8, CYP8A1	Síntese de prostaglandinas
CYP4F12, CYP4F2, CYP4F3	Metabolismo de leucócitos

*Fonte:* Seliskar, Rozman, 2007

Essa classificação não é absoluta, visto que uma mesma molécula pode ser substrato para as diversas isoenzimas citocromo P450 e ainda, cada isoforma de CYP aceita uma série de substratos com ampla diversidade de estruturas químicas. Assim, CYPs envolvidos no metabolismo de xenobióticos também podem participar da transformação de substratos endógenos (Parkinson, 2001).

Variáveis como o órgão, a idade, a saúde, o sexo, o estresse e a exposição às substâncias químicas determinam os tipos e a quantidade de citocromo P450 (Gandolfi e Sipes, 1991; Gibson e Skett, 1994). O aumento na atividade dessas enzimas pode ser resultado de (1) duplicação gênica que promove a super expressão de uma enzima

citocromo P450; (2) a indução da síntese de citocromo P450 (aumento da transcrição ou estabilização de RNA mensageiro) por exposição a fatores ambientais como os xenobióticos ou ainda (3) estabilização da enzima (apoproteína) já existente por exposição a um xenobiótico. Já a diminuição na atividade das enzimas pode ser devido a (1) uma mutação capaz de bloquear a síntese de uma enzima CYP ou levar à síntese de uma enzima inativa ou cataliticamente comprometida; (2) uma exposição a algum fator ambiental (doenças infecciosas, ou xenobióticos) que suprime a expressão da enzima citocromo P450 ou (3) exposição a um xenobiótico capaz de inibir ou inativar a enzima CYP pré-existente (Parkinson, 2001).

### 1.2.3 Polimorfismo genético no gene *CYP1A1*

O *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15q22-q24 e apresenta sete exons. A isoenzima CYP1A1 é capaz de metabolizar mais de vinte substratos. Sua função é a detoxificação de xenobióticos nos seres humanos como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), em produtos fenólicos e epóxidos, aminas heterocíclicas e aminas aromáticas (Gonzalez *et al.*, 1998; Lewis, 1996; Scott, 1999; Parkinson, 2001; Costa, 2011).

O gene *CYP1A1* é amplamente expresso em tecidos extra-hepáticos e é um dos três membros da família CYP1. A indução da expressão do gene ocorre pela ligação do composto indutor ao receptor. Isto ativa a transcrição de outros genes responsáveis por codificar proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos (Hawajiri *et al.*, 1993).

Na literatura há a descrição de dois polimorfismos associados ao gene *CYP1A1*. O polimorfismo m1 (*CYP1A1m1*), ou *CYP1A1\*2A*, apresenta uma transição de nucleotídeos, T → C, que acontece no exon 7 com 1194 pb, na região 3' não codificadora. Essa mudança cria um novo sítio de clivagem para MspI e leva a um aumento da atividade catalítica da enzima que pode conferir uma suscetibilidade aumentada ao câncer. Isto se deve ao fato de haver uma maior ativação de pró-carcinógenos na fase I da biotransformação (Goto *et al.*, 1996; Fontana *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2009). No polimorfismo m2 (*CYP1A1\*2B*) há a transição de A → G que acarreta na substituição de um aminoácido valina por isoleucina no códon 462 que afeta a região de ligação heme da enzima (Miyoshi e Noguchi, 2003; Slattery *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

Existe uma grande variabilidade na capacidade de ativar ou inativar compostos com potencial genotóxico ou carcinogênico e isso é, provavelmente, influenciado pelos polimorfismos dos genes que codificam as enzimas de metabolização (Lang e Pelkonen, 1999; Canalle *et al.*, 2004). O polimorfismo é capaz de determinar a eficiência ou deficiência do metabolismo das drogas e outros compostos (Ingelman-Sundberg, 2004). Dessa forma, dependendo do tipo de reação mediada pelas enzimas, os polimorfismos podem conferir vantagens ou desvantagens na suscetibilidade a certas patologias (Daly *et al.*, 1993).

### **1.3 O gene *TP53* (*Tumor Protein 53*)**

A proteína codificada pelo gene *TP53* foi descoberta em 1979 por dois grupos de pesquisadores. Um deles era liderado por David Lane da Universidade de Dundee, no Reino Unido, e o outro por Arnold Levine da Universidade de Princeton, nos Estados Unidos da América (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine 1979). Eles identificaram a proteína p53 que formava um complexo com o antígeno T do vírus símio 40 (SV-40) em células hospedeiras (Lane e Crawford, 1979). Inicialmente, acreditava-se que era uma proteína codificada por um oncogene devido ao fato de o antígeno T ser uma oncoproteína viral e da descoberta de grandes concentrações de p53 em células tumorais ou transformadas (Crawford *et al.*, 1984). Porém, essa hiper-expressão era resultados de algumas formas mutantes do gene (Linzer e Levine, 1979).

Em 1989, demonstrou-se que o tipo selvagem de *TP53* era capaz de inibir a transformação maligna de células e o crescimento de linhagens defeituosas através da ação de sua proteína p53. A partir de então o gene passou a ser considerado como supressor tumoral (Finlay, Hinds e Levine, 1989; Baker *et al.*, 1990).

Os genes supressores de tumor são genes que codificam proteínas capazes de regular negativamente o crescimento e a sobrevivência celular, o que diminui a proliferação maligna de células (Donehower, 2005). O gene *TP53* é um dos supressores tumorais mais estudados e está situado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1), possui peso molecular de 20Kb e é constituído por 11 éxons, no qual o primeiro é não codificante. O seu produto de transcrição é a fosfoproteína nuclear p53 de 53 quilodáltons (kDa) e 393 aminoácidos. Os éxons 2, 4, 5, 7 e 8 são os responsáveis pela codificação de 5 grupos de sequências de aminoácidos (domínios) da proteína. Cada

domínio da proteína tem uma função específica (May e May, 1999; Ortega, 2002; Sutcliffe e Brehm, 2004; Levine *et al.*, 2006; Bojesen e Nordestgaard, 2008).

O gene *TP53* faz parte de uma família de genes altamente conservados que apresenta outros dois membros: *TP63* e *TP73*. Os três regulam grupos similares de genes, e suas proteínas são estruturalmente semelhantes, apresentam domínios de transativação, ligação ao DNA (65% de identidade com a p53) e tetramerização, entretanto apenas o P53 é um supressor tumoral (Yang *et al.*, 2002; Gallo *et al.*, 2005; Oliveira, 2005).

Mutações no gene *TP53* são uma das alterações genéticas mais comumente encontradas numa variedade de cânceres (Hollstein *et al.*, 1994). A mutação, por alteração na sequência, prolonga a meia-vida da proteína e gera uma hiperexpressão nuclear. No entanto, devido à alteração na estrutura, ela não é mais capaz de regular a proliferação celular (Smith *et al.*, 2003).

### **1.3.1 O polimorfismo Arg/Pro do códon 72 do gene *TP53***

Os polimorfismos genéticos são uma forma de alteração genética mutacional e sua frequência na população é acima de 1%. Um deles é o Polimorfismo de Nucleotídeos Únicos (SNP = *single nucleotide polymorphism*) que é uma substituição de um único nucleotídeo na sequência de DNA. Essas variações têm capacidade de criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição (Ferreira e Rocha, 2004; Lima *et al.*, 2006; Bojesen e Nordestgaard, 2008). Em sua maioria, os SNP não estão associados a um fenótipo característico. Algumas alterações ocorrem em sequências não codificantes do gene e, geralmente, não afetam suas funções. Já as que ocorrem nas sequências codificantes podem alterar o produto de transcrição. Assim, a manifestação, em alguns casos, pode ser uma suscetibilidade ao câncer uma vez que as proteínas apresentarão atividades irregulares capazes de desregular a homeostase celular (Lodish *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2006).

O gene *TP53* possui vários polimorfismos diferentes e suas sequências nucleotídicas estão descritas no banco de dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC – *International Agency Research on Cancer*) em Lyon, na França (Petitjean *et al.*, 2007).

O SNP do códon 72 é muito estudado visto que a alteração ocorre na sequência codificante do gene e, está associada à vulnerabilidade a certos cânceres (Gallo *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 2006). O códon 72 do éxon 4 tem capacidade de codificar o aminoácido arginina (p53Arg) ou prolina (p53Pro) (Bhattacharya *et al.*, 2002; Lattuada *et al.*, 2004). A simples troca de uma base púrica por uma pirimídica (CGC para CCC) no códon resulta em alteração estrutural da proteína p53. O códon CGC codifica arginina e o CCC a prolina (Thomas *et al.*, 1999; Tada *et al.*, 2001). Os dois alelos, p53Arg e p53Pro, dão origem a três genótipos diferentes em humanos: os homozigotos p53ArgArg e p53ProPro e o heterozigoto p53ArgPro. Essas variações têm demonstrado possuir diferenças funcionais que alteram a conformação da proteína. Tais alterações podem ser visualizadas nos diferentes padrões de migração de eletroforese além das propriedades bioquímicas e biológicas diferentes (Harris *et al.*, 1986; Matlashewski *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1999; Lattuada *et al.*, 2004). A presença do resíduo Arg72 ou Pro72 é de fundamental importância para a ligação das proteínas da família ASSP ao DNA que estão relacionadas com o crescimento celular e a apoptose durante a oncogênese em tumores (Bergamaschi *et al.*, 2006).

Esse polimorfismo ocorre numa sequência rica em resíduos de prolina (aminoácidos 61 a 94) e apresenta um domínio de ligação SH3 essencial no processo de apoptose mediado pela p53, porém não participa do bloqueio do ciclo celular (Walker e Levine, 1996; Sakamuro *et al.*, 1997). Estudos destacam que a forma Arg72 possui um potencial indutor de apoptose superior ao Pro72, cerca de 15 vezes (Dumont *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2004). Acredita-se que um dos fatores seja a maior capacidade da variante Arg72 se localizar na mitocôndria com a consequente liberação do citocromo C no citosol (Dumont *et al.*, 2003). A variante Pro72, por sua vez, tem maior eficácia na indução do bloqueio do ciclo celular na fase G1 e na ativação dos mecanismos de reparo p53-dependentes (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003; Siddique *et al.*, 2006; Ørsted *et al.*, 2007; Bojesen e Nordestgaard, 2008).

As variantes polimórficas do códon 72 possuem distribuição étnica e geográfica distintas. A frequência do p53Pro é de aproximadamente 60-70% em afro-descendentes e de 10-35% em caucasianos. É possível que o p53Pro seja o alelo mais antigo e sua frequência está relacionada à exposição aos raios ultravioleta (Dumont *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2006; Murphy, 2006; Bojesen e Nordestgaard, 2008). Já a frequência do alelo p53Arg em caucasianos é de 70%, aproximadamente (Donehower *et al.*, 2005).

### 1.3.2 A proteína p53

A proteína p53 é um fator de transcrição, ou seja, liga-se à região reguladora do gene (fundamental para a indução da transcrição pela RNA polimerase) e promove um efeito inibidor sobre a proliferação celular (Kern *et al.*, 1991; Farmer *et al.*, 1992; Lane, 1992). Está envolvida na regulação do ciclo celular, no reparo do DNA lesado e na apoptose (Soussi e Beroud, 2001). É denominada de “guardiã do genoma”, pois sua regulação tem efeitos anti-proliferativos que permitem a preservação da informação genética. (Lane, 1992; Cadwell e Zambetti, 2001). Pelo fato de ser um fator de transcrição sequência-específico a proteína tem capacidade de regular todos esses processos pela interação com sequências conservadas, geralmente presentes na região promotora de seus genes alvo, e da ligação direta a sequências não específicas no DNA (Sengupta e Harris, 2005).

Essa proteína apresenta 393 aminoácidos que estão distribuídos em 5 regiões com funções distintas denominadas de domínios funcionais. O domínio inicial é formado pela extremidade amino-terminal (N-terminal, aminoácidos de 1 a 62) e contém o domínio de transativação (aminoácidos de 20 a 60). Logo em seguida, há um domínio rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97) e a porção central (aminoácidos 102 a 292). Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal) estão os domínios de tetramerização (aminoácidos 323 a 356), o que confere a configuração espacial da proteína, e de regulação (aminoácidos 363 a 393) (Achatz, 2008).

Os domínios apresentam funções específicas e dessa forma cada um atua num determinado momento da atividade da p53. O domínio de transativação é o responsável pela ativação específica de certos genes e apresenta um sítio de ligação à proteína *HDM2* (forma humana da proteína *MDM2* - *Murine Double minute 2 protein*). O domínio central é o que se liga a sequências específicas do DNA. É considerado o principal domínio da proteína e alvo de 97% das mutações de p53 mapeadas em tumores humanos (Olivier *et al.*, 2002) o que impede a ligação da p53 ao DNA (Bullock *et al.*, 2001). O domínio de tetramerização é o responsável pela formação dos tetrâmeros de p53, ou seja, a forma ativa (selvagem ou *wild-type*) da molécula. O domínio regulatório tem a função de se ligar ao domínio central de ligação ao DNA, regulação negativa deste domínio, e impedir a interação da proteína com os promotores de genes. Esse domínio tem capacidade de se ligar ao DNA de forma independente de

especificidade de sequência (Foord *et al.*, 1991; Özören e El-Deiry, 2000; van Oijen *et al.*, 2000; Silva, 2003; Oliveira, 2005; Smith *et al.*, 2007; Madhumalar *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2008).

A proteína p53 está expressa de forma latente numa grande variedade de células e tecidos, como uma proteína reguladora. Possui vida média curta, cerca de 5 a 20 minutos, e por isso ela não se acumula no núcleo exceto quando é estabilizada em resposta ao estresse. Então, quando não há sinais de estresse celular a p53 se encontra na forma inativa, porém é rapidamente ativada e se acumula diante de ameaças. A ativação é feita pela fosforilação e ambas as regiões N- e C-terminal apresentam múltiplos sítios de fosforilação ativados por quinases (Pluquet e Hainaut, 2001; Guimarães e Hainaut, 2002; Silva, 2003; Achatz, 2008).

Diversos são os sinais de estresse celular que desencadeiam a estabilização e o acúmulo da p53 por meio de modificações pós-traducionais como: danos ao DNA (estresse genotóxico), hipóxia, excesso de sinais de crescimento e de oncogenes (estresse oncogênico). Assim, permite-se que o DNA seja reparado pela parada da progressão do ciclo celular nos pontos de checagem (*checkpoints*) (Sutcliffe e Brehm, 2004; Oliveira, 2005; Levine *et al.*, 2006).

A quantidade de p53 nas células é determinada pela taxa relativa entre produção e degradação e, a proteína HDM2 é o principal regulador. Esta proteína é a forma humana do gene MDM2 (*murine Double minute 2 protein*). Quando há excesso de p53 ela se liga à região regulatória da MDM2 estimulando sua transcrição. Após a tradução, a HDM2 se liga à região N-terminal da p53 e forma o complexo p53/HDM2 que torna possível a passagem da p53 do núcleo para o citoplasma. Neste, há a adição de grupos ubiquitina que levam à degradação da p53 pelos proteassomos (processo de proteólise). Dessa forma, diminui a concentração de p53 e, conseqüentemente, da transcrição de HDM2 finalizando o *feedback*. Diante das ameaças, o acúmulo de p53 ocorre devido a uma maior estabilidade adquirida pela menor interação entre a proteína e a HDM2 (Momand e Wu e Dasgupta, 2000; Alarcon-Vargas e Ronai, 2002; Slee *et al.*, 2004; Ferreira e Costa, 2004; Achatz, 2008).



### 1.3.3 A p53 e o controle do ciclo celular e da apoptose

A proteína p53 regula o crescimento e a proliferação das células por meio do controle do ciclo celular para a promoção de reparos do DNA lesado. Quando o reparo celular não é possível a proteína induz a apoptose (Attardi, 2005). A via a ser seguida pela célula depende de alguns fatores: da natureza e do tamanho do estresse sofrido por ela, do tecido em que ela se encontra e a sua diferenciação celular e ainda da capacidade da mesma em restaurar o seu DNA lesado. Assim, é possível garantir a manutenção da integridade genômica e o controle da proliferação celular (Ferreira e Oren e Rotter, 1999; Klumb *et al.*, 2002; Rocha, 2004; Achatz, 2008).

Para que a proteína possa desempenhar sua função regulatória, as moléculas devem se associar para a formação dos tetrâmeros. É a partir da fosforilação que a proteína se torna ativa e tem capacidade de regular o ciclo celular ou induzir a morte programada da célula (Silva, 2003).

#### 1.3.3.1 O ciclo celular

O ciclo celular compreende uma sequência ordenada de fases (ou *gaps*) em que ocorre a síntese de RNA e proteína. Entre essas fases existem os pontos de checagem (*checkpoint*). São mecanismos de controle de qualidade que asseguram que cada evento do ciclo celular é corretamente terminado antes do próximo evento ser iniciado (Kaufmann e Paules, 1996; Ferreira e Rocha, 2004).

A progressão do ciclo é controlada, em parte, por enzimas denominadas de ciclinas e de quinases dependentes de ciclinas - CDK - (*cyclin-dependent kinase*) que se combinam e atuam em fases específicas (Ferreira e Rocha, 2004). Os níveis de ciclina se alteram nas diferentes fases do ciclo dependendo do momento certo da sua ligação com as CDKs. Estas são responsáveis pela fosforilação de substratos fundamentais para a progressão do ciclo, de uma fase à outra. As CDKs são controladas pelas inibidoras de CDKs (CDKIs – *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*) que são divididas em duas famílias, de acordo com seu mecanismo de ação, homologia e CDK alvo: 1) CIP/KIP: proteínas p21, p27 e p57; 2) INK4: proteínas p15, p16, p18 e p19 (O' Neill, 2000).

A célula em G0 encontra-se diferenciada e em quiescência. Quando existe estímulo mitogênico a célula passa para a fase G1 em que sintetiza proteínas,

fundamentais para a síntese de DNA, e aumenta sua massa para a divisão celular. O ponto de restrição (R), ainda em G1, é o momento em que a célula se compromete a entrar na fase seguinte (fase S – Síntese) e prosseguir com a divisão. Na fase S ocorre a duplicação do DNA e é seguida pela fase G2. Nesta, a célula produz proteínas necessárias para a reorganização da cromatina e para a mitose (M). Por fim, na fase mitótica o DNA que foi duplicado é dividido equitativamente entre as células filhas (Ferreira e Rocha, 2004).

Existem três pontos de checagem básicos nas células eucariotas. O primeiro ocorre antes da replicação na fase S, na transição G1/S. O segundo *checkpoint* acontece na fase G2 para verificar a qualidade do DNA que foi replicado e, o terceiro ocorre durante a mitose. Se qualquer dano ao DNA for detectado, a p53 se torna estável e para o ciclo celular em G1 e/ou G2/M para que o reparo necessário seja realizado ou para que a célula entre em apoptose, em resposta a danos mais extensos e não passíveis de reparação (Vogelstein *et al.*, 2000; Achatz, 2008).

### **1.3.3.2 p53 e o bloqueio do ciclo celular**

Frente a algum dano à integridade da informação genética a p53 é ativada por fosforilação em sua porção N-terminal. Dessa forma, a p53 não é capaz de se ligar ao DNA de forma específica. Isso é resultado da ligação da extremidade C-terminal da proteína com o domínio central, ou seja, o bloqueio desse domínio. Dessa maneira a p53 se liga ao DNA de maneira mais eficaz e pode cumprir seu papel de fator de transcrição (Oliveira, 2005).

Diversos são os genes regulados pela p53 que estão envolvidos no bloqueio do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA. O gene WAF1 (fragmento 1 ativador de p53 do tipo selvagem) é ativado pela p53 e codifica a proteína p21 (uma CDKI) um inibidor universal da atividade das CDKs que atua na fase G1 (Sabah *et al.*, 2007). A p21 se liga e inativa a ciclina E/CDK2 que por sua vez fica incapacitada de fosforilar as proteínas da família do retinoblastoma (pRB). Hipofosforilada a pRB se liga ao fator de transcrição E2F (fator de transcrição - fator de alongamento 2) fundamental para a expressão de genes da fase S do ciclo celular. Assim, ocorre o bloqueio do ciclo (Harper *et al.*, 1993; Ferreira e Rocha, 2004; Sancar *et al.*, 2004).

A p53 também atua na fase G2 através da transcrição do gene GADD45 (Gene que induz a correção de lesão do DNA) que codifica uma proteína similar a p21. Esta inibe a síntese de DNA pela ligação ao PCNA (Smith *et al.*, 2000; Zhan, 2005).

### 1.3.3.3 p53 e apoptose

Quando o dano genômico não é passível de reparo a célula sofre apoptose, prevenindo a geração de tumores, que pode ser mediada pela p53. O gene p53 desencadeia uma cascata de sinais que culmina com a morte celular programada (Granja, 2005).

A indução da apoptose pode ser realizada por duas vias diferentes: extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial). A p53 possui envolvimento na via extrínseca, no entanto a morte celular é desenvolvida preferencialmente pela via intrínseca (Grivicich, *et al.*, 2007; Batista, 2008).

Há uma família de cisteínas proteases da qual as caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem. As caspases são capazes de reconhecer e clivar substratos que apresentem resíduos de aspartato. Das 14 caspases humanas conhecidas, 6 participam da apoptose (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10). Um dos substratos é a proteína HDM2 que se liga à p53 e a mantém no citoplasma. Quando clivada pelas caspases a HDM2 libera a p53 e esta se transloca para o núcleo onde ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos (Grivicich, *et al.*, 2007).

Uma outra família é constituída por proteínas indutoras e repressoras da apoptose, a Bcl2, cuja transcrição é regulada pela p53. A proteína Bax é pró-apoptótica e a Bcl-2 é antiapoptótica. A Bax causa a permeabilização da membrana mitocondrial externa com a consequente liberação de citocromo c e o início dos eventos apoptóticos (Miyashita e Reed, 1995). O equilíbrio entre a BAX e a BCL-2 pode ser modificado pela p53 de forma a favorecer a morte celular (Sabah *et al.*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

Ocorreu nas últimas décadas um aumento significativo no número de pacientes inférteis com endometriose. Tal constatação pode representar apenas o aumento na prevalência da patologia na população feminina ou, simplesmente, a melhora da investigação diagnóstica do casal infértil, sobretudo com o desenvolvimento da videolaparoscopia como instrumento diagnóstico fundamental desta patologia. É uma das patologias mais encontradas na clínica ginecológica (Abrão, 2000).

De acordo com a literatura, a incidência da endometriose em mulheres com infertilidade varia de 6 a 58% (Hasson, 1976; Wheeler, 1989), e 30 a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (Fedelle *et al.*, 1992; Thomas, 1993). Além disso, afeta mulheres na idade reprodutiva, ou seja, uma fase importante de relações pessoais e profissionais. A ocorrência da endometriose compromete a qualidade física e emocional devido aos sintomas debilitantes da doença (Valadares, 2006).

O tempo médio estimado para que se tenha o diagnóstico é em torno de 8 a 12 anos devido às limitações de investigação diagnóstica. A laparoscopia é considerada o padrão ouro no diagnóstico da endometriose, porém é um procedimento invasivo. É necessário encontrar formas diagnósticas não cirúrgicas que possam ser empregadas no prognóstico da doença (Pugsley e Ballard, 2007).

O número de estudos de mapeamento de genes relacionados com a doença tem aumentado nos últimos anos. Polimorfismos nos genes *TP53*, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* e no receptor de progesterona (PROGINS) foram correlacionados com a endometriose e com o grau de severidade da doença (Carvalho *et al.*, 2004; Nakata, 2004; Hsieh e Lin, 2006; Ribeiro Júnior, 2009; Silva, 2010; Frare, 2011).

Este estudo visa comparar dois grupos de pacientes sendo um de portadoras de endometriose, férteis e inférteis, e outro de mulheres que não apresentam queixa quanto à patologia, o grupo controle. A avaliação será realizada quanto à frequência dos polimorfismos dos genes *CYP1A1m1* e *TP53* para analisar se há diferença significativa entre os dois grupos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o polimorfismo dos genes *TP53* e *CYP1A1m1* no grupo de mulheres com diagnóstico de endometriose e no grupo controle.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar a frequência dos genótipos (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro) do polimorfismo do *TP53* e do *CYP1A1m1* (w1/w1, w1/m1, m1/m1) nas pacientes com endometriose e no grupo controle;
- Analisar a frequência da associação entre os polimorfismos dos genes *TP53* e *CYP1A1m1* nos grupos endometriose e controle;
- Pesquisar a correlação entre cor da pele, tabagismo, etilismo, uso de contraceptivos e prática de atividade física com os diferentes genótipos do polimorfismo do gene *CYP1A1m1*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

O grupo de estudo foi composto por 21 amostras de biópsia de endométrio de pacientes com endometriose. Elas foram divididas em dois grupos com 07 e 14 pacientes em que havia queixa de infertilidade e não havia queixa de infertilidade, respectivamente. As amostras foram enviadas ao laboratório congeladas em tubo *ependorf* com tampão PBS. O grupo controle foi composto por 30 amostras sanguíneas de mulheres que não apresentavam a clínica da doença. Foram coletados 15 mL de sangue venoso dessas pacientes. Inicialmente, havia 40 amostras de biópsia de endométrio. Devido às adversidades de extração de DNA ou das amostras apresentarem resultado para apenas um gene (*CYP11b1* ou *TP53*) o grupo amostral foi reduzido para 21 amostras.

A pesquisa foi analisada e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Todas as pacientes que participaram do estudo responderam a um questionário sobre os hábitos sociais (anexo I) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexos II e III).

### **4.2 Extração de DNA genômico**

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de biópsia de endométrio utilizando o Kit de extração *Illustra Genomic Blood* (GE Healthcare, USA) conforme especificações do protocolo fornecido pelo fabricante. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizada no Sistema de Vídeo Foto Documentação VDS® (*Image Master VD*® - Amersham Pharmacia Biotech, USA). As amostras foram mantidas à temperatura de -20°C até a amplificação por PCR.

### **4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para genotipagem do *TP53***

Os polimorfismos do gene *TP53* foram analisados a partir do DNA genômico por duas reações de PCR com o uso de dois *primers* para genotipagem dos alelos

p53Arg e p53Pro, em volume de 25µL. As tabelas II, III e IV apresentam os diferentes *primers* e as diferentes condições de termociclagem, respectivamente, utilizados na amplificação que permitiram diferenciar as duas variantes polimórficas de acordo com o tamanho do produto amplificado. Os protocolos de amplificação estão resumidos nas tabelas V e VI.

**Tabela II:** Sequência dos *primers* analisados nas amostras de DNA.

Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto
P53 ARG	F-5' CTG GTG CAG GGG CCA CGC -3'	141 pb
	R-5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT -3'	
P53 PRO	F-5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC -3'	177 pb
	R-5' ATC TAC AGT CCC CCT TGC CG -3'	

pb: pares de base (Fonte: Storey et al.,1998).

**Tabela III:** Protocolo de Termociclagem para amplificação do *primer* p53ARG.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	54°C	1	35
Extensão	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

Posteriormente, o produto obtido em cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em um campo elétrico de 10V/cm e, em seguida, corado com brometo de etídio (5µg/mL). O registro visual do gel foi realizado com o auxílio do aparelho Sistema de Vídeo Foto Documentação VDS® (*Image Master VD*® - *Amercham Pharmacia Biotech*, USA).

A avaliação do gel permite que seja visualizada a presença/ausência de bandas para os alelos p53Arg e p53Pro e, portanto, que seja determinada a genotipagem de cada paciente em Pro/Pro, Arg/Arg ou Pro/Arg.

**Tabela IV:** Protocolo de Termociclagem para amplificação do *primer* p53PRO.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	54°C	1	35
Extensão	70°C	1	
Extensão final	70°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

**Tabela V:** Protocolo para a amplificação de p53ARG.

Reagentes	[ ] reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão (10x)	1X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 mM	2,0 µl
dNTPs	1,25 mM de cada	2,0 µl
Taq polimerase 5 U/µl	2,0 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	---	15,3 µl
DNA amostra	200 ng/µL	2,0 µl
Volume final		25,0 µl

**Tabela VI:** Protocolo para a amplificação de p53PRO.

Reagentes	[ ] reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão (10x)	1X	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5 mM	2,0 µl
dNTPs	1,25 mM de cada	2,0 µl
Taq polimerase 5 U/µl	2,0 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	---	15,3 µl
DNA amostra	200 ng/µL	2,0 µl
Volume final		25,0 µl



#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação do gene *CYP1A1*

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para amplificação do gene *CYP1A1* com a posterior digestão enzimática. Os *primers* utilizados estão resumidos na tabela VII e as condições de termociclagem e os protocolos de amplificação estão explicitados nas tabelas VIII e IX, respectivamente.

**Tabela VII:** Sequência nucleotídica dos *primers* *CYP1A1*.

Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto
CYP1A1	F: TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT	340 pb
	R: CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT	

Fonte: Mota et al, 2010.

**Tabela VIII:** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* *CYP1A1*.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5	1
Desnaturação	94°C	1	
Anelamento	56°C	1	30
Extensão	72°C	1,5	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

**Tabela IX:** Protocolo para a amplificação do gene *CYP1A1*.

Reagentes	[ ] reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão (5x)	1X	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 mM	1,5 µl
dNTPs	1,25 mM de cada	4,0 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	---	10,3 µl
DNA amostra	200 ng/µL	3,0 µl
Volume final		25,0 µl

Novamente, o produto obtido da reação em cadeia da polimerase 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 aparelho de Vídeo Documentação VDS® (*Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, USA*).

#### 4.5 Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

A técnica PCR-RFLP foi empregada para detecção do polimorfismo *CYP11A1m1*. Os fragmentos amplificados através da PCR foram avaliados por meio da digestão enzimática com a enzima de restrição *MspI* pronta para uso (Fermentas, CN). O protocolo para o procedimento da digestão enzimática está descrito na tabela X.

**Tabela X:** Reagentes utilizados no processo de restrição enzimática e as concentrações utilizadas.

Reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão da enzima	4,0 µL
Enzima de restrição <i>MspI</i>	1,0 µL
Água MiliQ	10,0 µL
PCR	15,0 µL
Volume total	30,0 µL

A mistura dos reagentes utilizados para a digestão enzimática permaneceu à 37°C durante 12 horas para a análise do polimorfismo *CYP11A1m1*. Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo. O fragmento para o alelo selvagem m1(w1/w1) foi de 340 pb, o heterozigoto (w1/m1) apresentou fragmentos de 340pb, 200pb e 140pb, e homozigoto mutante (m1/m1) de 200pb e 140pb (tabela XI).

**Tabela XI:** Sequência de clivagem e tamanho dos fragmentos esperados.

Enzima de restrição	Sequência de reconhecimento	Tamanho do produto
MspI	5' - C*CGG - 3'	340 pb (Homozigoto selvagem)
	3' - GGC*C - 5'	140 pb e 200 pb (Homozigoto mutante)
		140 pb, 200 pb e 340 pb (Heterozigoto)

\*Sítio de clivagem

#### 4.6 Análise dos resultados

As idades entre os grupos caso e controle foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparar a distribuição dos diferentes genótipos nos grupos caso e controle. Os cálculos de probabilidade de associação entre as características analisadas foram realizados pelo Teste Exato de Fisher e pelo teste Qui-quadrado quando o primeiro não pode ser empregado. O Odds Ratio (OR) e seus intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados com a finalidade de avaliar a intensidade da associação entre os grupos endometriose e controle. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados significantes. O *software* utilizado para a realização dos testes estatísticos foi o Bioestat versão 5.0 (Ayres e Ayres, 2007).

## 5. RESULTADOS

Os pacientes estudados foram divididos em dois grupos (1) grupo endometriose composto por pacientes que apresentam endometriose e (2) grupo controle composto por pacientes que não apresentam a clínica da doença. O grupo endometriose foi ainda dividido em dois outros subgrupos (a) um subgrupo com queixa de infertilidade e (b) subgrupo sem queixa de infertilidade. O grupo analisado foi composto por 63 pacientes das quais 21 (33%) compõem o grupo caso e 42 (67%) compõem o grupo controle.

Do total de amostras analisadas, o grupo endometriose (n=21) apresentou média de idade de 30,5 anos (DP= +/- 3,2). O grupo controle apresentou idade média de 30,2 anos e (DP= +/- 3,0). Logo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades dos grupos caso e controle (p=0,38) de acordo com o Teste de Mann Whitney.

As frequências dos genótipos w1/w1, w1/m1 e m1/m1, do gene *CYP11A1m1*, nos grupos endometriose e controle, foram avaliadas e os resultados estão expressos na tabela XII. A presença do genótipo w1/w1 foi encontrada em 57% (n=12) das pacientes com endometriose e em 86% (n=36) das pacientes do grupo controle. O genótipo w1/m1 foi encontrado em 38% (n=8) no grupo endometriose e em 14% (n=6) no grupo controle. Já o genótipo m1/m1 foi encontrado em 5% (n=1) no grupo endometriose e em nenhuma paciente do grupo controle. A frequência do genótipo w1/m1 (38%) foi aproximadamente o triplo no grupo endometriose se comparado com o grupo controle (14%), sendo estatisticamente significativa (p=0,02).

**Tabela XII:** Frequência dos genótipos w1/w1, w1/m1+m1/m1 do gene *CYP11A1m1* entre os grupos endometriose e controle.

Variável	Endometriose		Controle		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	57	12	86	36	
w1/m1+m1/m1	43	9	14	6	0,02
Total	100	21	100	42	

\*P valor do teste de Fisher.

A frequência dos genótipos do *CYP11A1m1* foi comparada com a classificação da endometriose em Grau I/II (n=11) e Grau III/IV (n=10) (tabela XIII). Verificou-se que

54,5% (n=6) das pacientes apresentam genótipo w1/w1, 45,5% (n=5) apresentam genótipo w1/m1+m1/m1. Quanto ao Grau III/IV, o genótipo w1/w1 foi de 60% (n=6), o w1/m1+m1m1 foi de 40% (n=4). Logo, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo do gene *CYP1A1* com a severidade da doença (p=0,58).

**Tabela XIII:** Distribuição genotípica do *CYP1A1m1* entre os Graus I/II e III/IV no grupo endometriose.

Grupo	Grau I/II		Grau III/IV		*P	OR	Min	Max
	%	N	%	N				
w1/w1	54,5	6	60	6				
w1/m1 + m1/m1	45,5	5	40	4	0,58	0,8	0,14	4,6
Total	100	11	100	10				

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

As pacientes com endometriose foram divididas em dois grupos denominados de fértil e infértil (tabela XIV) e correlacionadas com o gene *CYP1A1m1*. Nas pacientes férteis (n=7) a frequência do genótipo homocigoto selvagem w1/w1 foi de 57% (n=4) enquanto os genótipos w1/m1+m1/m1 foi de 43% (n=3%). No grupo infértil (n=14), o genótipo w1/w1 foi de 57% (n=8) e os genótipos w1/m1+m1/m1 foi de 43% (n=6). Como os dados são homogêneos, não foi possível efetuar o cálculo do OR.

**Tabela XIV:** Distribuição genotípica do polimorfismo do *CYP1A1m1* entre as pacientes férteis e inférteis no grupo endometriose.

Grupo	Fértil		Infértil		*P	OR	Min	Max
	%	N	%	N				
w1/w1	57	4	57	8				
w1/m1 + m1/m1	43	3	43	6	0,68	-	-	-
Total	100	7	100	14				

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

A tabela XV mostra a distribuição genotípica do gene *CYP11A1m1* das pacientes quanto à prática de atividade física. No grupo endometriose 64% (n=9) praticam atividade física e apresentam genótipo w1/w1, enquanto que as que não praticam representam 43% (n=3). Das que apresentam os genótipos w1/m1+m1/m1, 36% (n=5) fazem alguma atividade física enquanto que 57% (n=4) não praticam nenhuma atividade e apresentam o mesmo genótipo. Assim, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,32).

**Tabela XV:** Distribuição genotípica do *CYP11A1m1* entre pacientes que fazem ou não atividade física no grupo endometriose.

Variável	Atividade Física		Sem Atividade Física		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	64	9	43	3	
w1/m1+m1/m1	36	5	57	4	0,32
Total	100	14	100	0	

\*P valor do teste de Fisher.

A tabela XVI explicita a correlação múltipla entre o polimorfismo do gene *CYP11A1m1* em pacientes com endometriose e que fazem uso de anticoncepcional. Em pacientes com endometriose e que fazem uso de anticoncepcional, o genótipo homocigoto selvagem (w1/w1) foi de 100% (n=4), enquanto que para as que não fazem uso foi de 47% (n=8). Para os genótipos w1/m1+m1/m1 a frequência das que não fazem uso de anticoncepcional foi de 53% (n=9). A avaliação não foi estatisticamente significativa (p=0,08).

**Tabela XVI:** Distribuição genotípica do *CYP11A1m1* na correlação múltipla entre o uso de anticoncepcional, ou não, o polimorfismo do gene e a endometriose.

Variável	Uso		Não uso		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	100	4	47	8	
w1/m1+m1/m1	0	0	53	9	0,08
Total	100	4	100	17	

\*P valor do teste de Fisher.

Quanto ao tabagismo, os cálculos não foram realizados, pois nenhuma das pacientes do grupo endometriose relatou este hábito. A tabela XVII apresenta a correlação entre as frequências genóticas do gene *CYP1A1m1* e o etilismo. As que possuem o hábito de consumir bebidas alcoólicas e apresentam o genótipo homozigoto selvagem (w1/w1) correspondem a 67% (n=2) das pacientes com endometriose, enquanto que as que não fazem uso a frequência foi de 56% (n=10). Para os genótipos w1/m1+m1/m1 a frequência no grupo endometriose etilista foi de 33% (n=1) contra 44% (n=8) no grupo não etilista. A avaliação não foi estatisticamente significativa (p=0,6).

**Tabela XVII:** Distribuição genotípica do *CYP1A1m1* quanto ao etilismo ou não no grupo endometriose.

Variável	Etilismo		Não etilismo		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	67	2	56	10	
w1/m1+m1/m1	33	1	44	8	0,6
Total	100	3	100	18	

\*P valor do teste de Fisher.

A tabela XIII apresenta a frequência genotípica relacionada com a etnia. No grupo endometriose, os indivíduos que se declararam brancos e apresentam o genótipo homozigoto selvagem w1/w1 correspondem a 53% (n=9), enquanto que os que possuem genótipos w1/m1+m1/m1 correspondem a 47% (n=8). No grupo controle, as pacientes brancas com o genótipo homozigoto selvagem são 84% (n=27). Já as pacientes brancas que possuem genótipos w1/m1+m1/m1 perfazem 16% (n=5). A frequência do genótipo w1/m1+m1/m1, nas pacientes brancas, no grupo endometriose é aproximadamente 3 vezes a do grupo controle, sendo estatisticamente significativa (p=0,02). Quanto as pacientes que se declararam não brancas, o genótipo w1/w1 foi de 75% (n=3) e o grupo controle foi de 80% (n=4). Para os genótipos w1/m1+m1/m1, 25% (n=1) das pacientes são não brancas e no grupo controle correspondem a 20% (n=1), sendo estatisticamente não significativa (p=0,72).

**Tabela XIII:** Distribuição genotípica do *CYP11A1m1* entre pacientes brancas e não brancas nos diferentes grupos estudados.

Grupos	Endometriose		Controle		*P	OR	Min	Max
	Branca		Branca					
Variáveis	%	N	%	N				
w1/w1	53	9	84	27				
w1/m1+m1/m1	47	8	16	5	0,02	0,21	0,05	0,80
Total	100	17	100	32				
	Não branca		Não branca					
w1/w1	75	3	80	4				
w1/m1+m1/m1	25	1	20	1	0,72	0,75	-	-
Total	100	4	100	5				

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

As frequências genotípicas do gene *TP53* (tabela XIX) em pacientes com endometriose para a variante Arg/Arg foi de 38% (n=8). Para o genótipo Arg/Pro foi de 52% (n=11) e para Pro/Pro foi de 10% (n=2). Quanto ao grupo controle, o genótipo homozigoto Arg/Arg corresponde a 57% (n=24) das pacientes. O heterozigoto Arg/Pro foi de 43% (n=18) e nenhuma paciente do grupo controle apresentou a variante homozigótica Pro/Pro. A avaliação não foi estatisticamente significativa (p=0,07).

As frequências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP11A1m1* foi correlacionada com o polimorfismo do gene *TP53* (tabela XX). Quanto a variante Arg/Arg, 33% (n=3) das pacientes com endometriose apresentaram o genótipo w1/w1 enquanto que 67% (n=6) apresentaram os genótipos w1/m1+m1/m1. O grupo controle apresentou 96% (n=23) do genótipo w1/w1 e 4% (n=1) os genótipos w1/m1+m1/m1, sendo a correlação estatisticamente significante (p=0,0005). Quanto as variantes Arg/Pro+Pro/Pro, 75% (n=9) das pacientes do grupo endometriose apresentaram o genótipo w1/w1 e 25% (n=3) os genótipos w1/m1+m1/m1. Já o grupo controle, 72% (n=13) apresentaram o genótipo w1/w1 enquanto que 28% (n=5) apresentaram os genótipos w1/m1+m1/m1. Essa correlação não foi estatisticamente significante (p=0,6).



**Tabela XIX:** Frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro do gene *TP53* entre os grupos endometriose e controle.

Variável	Endometriose		Controle		*P
	%	N	%	N	
Arg/Arg	38	8	57	24	
Arg/Pro	52	11	43	18	0,07
Pro/Pro	10	2	0	0	
Total	100	21	100	42	

\*P valor do teste  $\chi^2$

**Tabela XX:** Frequência genotípica do *CYP11A1m1* entre o grupo endometriose e o grupo controle correlacionada com o gene *TP53*.

Genótipo	Arg/Arg				
	Endometriose		Controle		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	33	3	96	23	
w1/m1+m1/m1	67	6	04	01	0,0005
Total	100	9	100	24	

Genótipo	Arg/Pro+Pro/Pro				
	Endometriose		Controle		*P
	%	N	%	N	
w1/w1	75	9	72	13	
w1/m1+m1/m1	25	3	28	5	0,6041
Total	100	12	100	18	

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

A frequência genotípica do gene *TP53* foi ainda correlacionada com os graus de severidade da endometriose. (tabela XXI). O homocigoto selvagem (Arg/Arg) representou 36% (n=4) das pacientes com endometriose de graus I/II, enquanto que a frequência nos graus III/IV foi de 40% (n=4). As pacientes com graus I/II e genótipos Arg/Pro+Pro/Pro foram 64% (n=7) enquanto que as que apresentam graus III/IV e

genótipos Arg/Pro+Pro/Pro foram 60% (n=6). A diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,61).

**Tabela XXI:** Distribuição genotípica do gene *TP53* entre os Graus I/II e III/IV no grupo endometriose.

Grupo	Grau I/II		Grau III/IV		*P	OR	Min	Max
	%	N	%	N				
Arg/Arg	36	4	40	4				
Arg/Pro+Pro/Pro	64	7	60	6	0.61	0,86	0,15	4,9
Total	100,0	11	100,0	10				

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

O gene *TP53* foi avaliado nas pacientes com endometriose tanto em sangue periférico quanto nas amostras de biópsia. A tabela XXII apresenta os resultados quanto à variação genotípica em ambas as amostras. Em sangue periférico, 33% (n=7) das pacientes apresentaram genótipo Arg/Arg. Em biópsia de endométrio a frequência para o genótipo homocigoto selvagem foi de 38% (n=8). Já para os genótipos Arg/Pro+Pro/Pro a frequência em sangue periférico foi de 67% (n=14) enquanto que em biópsia foi de 62% (n=13). A diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,5).

**Tabela XXII:** Frequência genotípica do gene *TP53* entre amostras de biópsia e sangue periférico no grupo endometriose.

Variável	Sangue Periférico		Biópsia de endométrio		*P
	%	N	%	N	
Arg/Arg	33	7	38	8	
Arg/Pro+Pro/Pro	67	14	62	13	0,5
Total	100	21	100	21	

\*Valor de P do teste Exato de Fisher.

## 6. DISCUSSÃO

A endometriose é uma condição complexa poligênica e multifatorial, ou seja, é causada pela interação de diversos genes e de fatores ambientais (Moura *et al.*, 1999). É caracterizada pela presença de tecido endometrial (glândula e estroma), funcionante e sensível, fora da cavidade uterina (Giordano, 1998). A hipótese diagnóstica é baseada, inicialmente, na história clínica da paciente e em procedimentos como ultrassonografia transvaginal e ressonância magnética (Farquhar, 2007). O diagnóstico é realizado por videolaparoscopia, no entanto algumas lesões podem não ser detectadas e a patologia pode ser confundida com outras condições (Barlow e Kennedy, 2005). Assim, a identificação de genes relacionados com a endometriose pode auxiliar no diagnóstico, pois define quais as vias que influenciam no processo (Santos *et al.*, 2010).

É crescente o número de estudos quanto a possíveis genes candidatos relacionados com a endometriose. Esses genes são escolhidos baseados em mecanismos biológicos que possivelmente contribuem para a doença. Montgomery e colaboradores (2008) realizaram uma revisão na literatura em busca desses genes candidatos. A maioria deles está relacionada com as vias de desintoxicação, vias de esteroides sexuais e vias de sinalização de citocinas, moléculas de adesão e enzimas do ciclo celular.

Um estudo sobre a associação dos polimorfismos do gene *CYP11A1* e *GSTM1* com a endometriose mostrou que a presença dos genótipos selvagens desses genes exercem efeito protetor quanto ao desenvolvimento da doença, com redução de 38 e 22%, respectivamente (Arvanitis *et al.*, 2003; Hadfield *et al.*, 2001). Outro estudo demonstrou que os polimorfismos w1/m1 e m1/m1 estão mais frequentes nas pacientes com quadro clínico mais severo da patologia (Souza, 2011). Em outros estudos não foi encontrada nenhuma relação entre a patologia e o polimorfismo do gene *CYP11A1* (Babu *et al.*, 2005; Guo, 2006; Hadfield *et al.*, 2001).

No presente estudo os genótipos com presença de alelo mutante, w1/m1 e m1/m1, do gene *CYP11A1*, apresentaram-se com uma frequência três vezes superior no grupo endometriose quando comparada com o grupo controle. Observa-se, portanto, que o alelo mutante está aumentado nas pacientes que apresentam a patologia seja em homozigose ou heretozigose. Além disso, os mesmos genótipos estiveram presentes com maior frequência na endometriose de graus I e II.

Estudos indicam a correlação entre a patologia e a etnia da paciente. O trabalho de Missmer e colaboradores (2004) mostrou que mulheres afro-americanas apresentaram menor incidência de endometriose quando comparadas com mulheres asiáticas e caucasianas. No entanto, foi discutido que tal resultado era consequência do mal diagnóstico realizado nas minorias raciais. Já Mengert (1966) descreveu que a menor incidência da doença em mulheres negras devia-se ao precoce início da vida sexual e a maior quantidade de gestações em relação às mulheres brancas. Acrescentou ainda que a mudança nos hábitos, e a melhora da situação econômica, dessas mulheres resultariam no aumento da taxa de endometriose demonstrando que a doença não tem relação com a etnia.

Neste estudo, o genótipo heterozigoto e o homozigoto mutante ( $w1/m1$  e  $m1/m1$ ), gene *CYP11A1*, foi aproximadamente três vezes maior nas pacientes brancas com endometriose em relação às pacientes brancas sem a doença. Não tivemos um número amostral significativo de pacientes de outras etnias com endometriose, o que nos leva a também a considerar hipótese do problema no diagnóstico e/ou frequência maior de partos, citado por outros autores. Além disso, deve-se considerar também que as amostras de endométrio foram coletadas numa clínica particular na cidade de Goiânia.

Vessey e colaboradores (1993) mostraram que o uso de pílula anticoncepcional mascara os sintomas da endometriose, pois a doença é suprimida durante o uso do medicamento e quando o mesmo é suspenso a doença se manifesta novamente. Frare (2011) encontrou diferença significativa no uso de pílulas e o gene *GSTM1*, no grupo que afirmou fazer uso do medicamento.

Costa (2010) analisou o polimorfismo do gene receptor PROGINS em pacientes com endometriose e sem clínica e no grupo controle quanto ao uso de contraceptivos. Observou-se que havia maior frequência de genótipo polimórfico para PROGINS nas pacientes que fazem uso do contraceptivo. O fato sugere que a endometriose não se desenvolvia devido ao uso da pílula e que esta atuaria como fator de proteção. No nosso estudo não houve relação significativa entre o uso de contraceptivo e o polimorfismo do gene *CYP11A1*.

Um estudo do tipo caso-controle foi realizado por Dhillon e Holt (2003) com o intuito de analisar a associação entre a endometriose ovariana cística (endometrioma) e a atividade física. O grupo foi composto por 77 pacientes com endometriose e 735

controles com idades que variavam de 18 a 39 anos. Foi observada uma diminuição significativa (70%) do risco de endometriose relacionada com atividade física recente, frequente, regular e de alta intensidade.

Petta e colaboradores (2002) afirmaram que o sistema imunológico da paciente melhora quando ela desempenha alguma atividade física. Assim, aumenta sua capacidade de suportar a dor. E se há a melhor no sistema imunológico o organismo tem maior facilidade em eliminar as células endometriais presentes em locais inadequados (coágulos ectópicos). Além disso, a prática de atividade física regular tem capacidade de inibir o estrógeno e a doença é estrógeno dependente. No nosso estudo não foi encontrada uma relação significativa entre a prática de atividade física e o polimorfismo genético do gene *CYP1A1*.

Estudos têm abordado questões de exposição à fumaça de cigarro e a reprodução quanto a atraso no tempo de concepção, efeitos no ovário e menopausa precoce, falhas de implantação, restrição de crescimento fetal e retardo de crescimento, anormalidades de placenta, baixa fecundidade, anomalias congênitas e efeitos sobre a reprodução masculina (Talbot e Riveles, 2005).

De acordo com Hediger e colaboradores (2005), o consumo de álcool e cafeína está associado a um maior risco de desenvolvimento de endometriose, enquanto o hábito de fumar teria efeito protetor. No entanto, a interpretação desses resultados é limitada, pois as variáveis são inúmeras como os diferentes períodos de tempo antes do diagnóstico, intervalo de tempo de referência para o grupo controle. Na nossa avaliação quanto ao polimorfismo do gene *CYP1A1* e o etilismo não houve relação significativa. Em relação ao fumo, os cálculos não foram realizados visto que nenhuma das pacientes do grupo endometriose apresentou esse hábito.

Pesquisadores japoneses descreveram a associação entre a prolina e a endometriose e ainda sugeriram o fator protetor do genótipo homocigoto arginina contra a doença. A mesma associação foi relatada na população chinesa, no entanto não foi a mesma num estudo na população italiana. Porém, outros dois estudos nesta população encontraram incidência aumentada da variante prolina nas formas mais graves da doença (Bianco, 2011). A frequência dos genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro, do gene *TP53* foi estudada, entre os grupos endometriose e controle. Não foi observada uma associação significativa entre o polimorfismo desse gene e o desenvolvimento da patologia.

Foi estudada a associação do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* com o polimorfismo do gene *CYP1A1* entre os grupos endometriose e controle. No grupo endometriose homozigoto para a variante arginina a presença do alelo mutante, heterozigose ou homozigose, foi aproximadamente 17 vezes superior quando comparado ao grupo controle. A distribuição genotípica do gene *TP53* associada aos graus da doença não foi significativa. O gene foi também avaliado e comparado em amostras de sangue periférico e tecido patológico (biópsia de endométrio de paciente com endometriose). A variação genotípica entre as diferentes amostras não foi estatisticamente significativa.

Ribeiro Júnior e colaboradores (2009) avaliaram o polimorfismo do gene *TP53* no códon 72 em dois grupos de pacientes com endometriose, um fértil e outro infértil. Quanto à distribuição do polimorfismo nos grupos não houve uma diferença significativa ( $p=0,1$ ). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes com genótipo homozigoto ou heterozigoto para prolina e dor intensa. A presença desse alelo está relacionada a pacientes com infertilidade e com quadro clínico mais grave da endometriose. O estudo concluiu que esse polimorfismo pode ser utilizado com um marcador molecular para a patologia associado a sintomas agravados e infertilidade.

Apesar do reduzido tamanho amostral desse estudo, o alelo mutante m1, do gene *CYP1A1*, comportou-se como um gene candidato para a avaliação de pacientes com endometriose independentemente da severidade da doença.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ Os grupos estudados (endometriose e controle) apresentaram idades homogêneas sendo essa diferença estatisticamente não significativa. No entanto, essa homogeneidade foi favorável, pois promoveu uma uniformidade nos grupos de estudo proporcionando melhor embasamento de resultados.
- ✓ Os genótipos  $w1/m1+m1/m1$  apresentaram uma frequência maior no grupo endometriose quando comparado com o grupo controle, o que indica a presença aumentada do alelo mutante  $m1$ , do gene *CYP11A1m1*, no grupo com endometriose, tanto em homozigose quanto em heterozigose.
- ✓ O alelo mutante esteve presente (genótipos  $w1/m1$  e  $m1/m1$ ) com maior frequência na endometriose de graus I e II, e apesar de não ter sido estatisticamente significativa, a diferença foi pequena quando comparada com a endometriose de graus III e IV, provavelmente devido ao reduzido tamanho amostral.
- ✓ Não foi encontrada significância estatística entre a distribuição genotípica do gene *CYP11A1m1* e a fertilidade/infertilidade.
- ✓ Não houve significância estatística entre a prática de atividade física e as frequências genotípicas do gene *CYP11A1m1* no grupo com endometriose. O desempenho dessa atividade não é cofator, juntamente com o genótipo, para o desenvolvimento da patologia.
- ✓ Resultados estatisticamente significativos não foram encontrados diante da relação entre a patologia e o uso ou não de anticoncepcionais e o etilismo.
- ✓ A presença do alelo mutante  $m1$ , gene *CYP11A1*, foi aproximadamente três vezes maior nas pacientes com endometriose que se declararam brancas quando comparadas com pacientes brancas sem a patologia.
- ✓ A presença do alelo mutante para o gene *CYP11A1m1*, tanto em homozigose quanto em heterozigose, foi aproximadamente dezessete vezes maior em pacientes com endometriose e genótipo  $Arg/Arg$ , para o gene *TP53*, quando comparadas com o grupo que não apresenta queixa sobre a doença, levando a possibilidade de o *CYP11A1* ser um melhor marcador diagnóstico que *TP53*.
- ✓ A associação entre a presença dos alelos  $m1$  e  $Pro$ , dos genes *CYP11A1m1* e *TP53*, respectivamente, não foi significativa para direcionar a severidade da endometriose.

- ✓ Não foi encontrada significância estatística quanto à variação genotípica do *TP53* entre as amostras de sangue periférico e o tecido patológico (biópsia de endométrio).



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrão MS. Endometriose uma visão contemporânea. Rio de Janeiro; Editora Revinter; 2000.
2. Achatz MIA SW. Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*: impacto dos polimorfismo intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo.
3. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2- the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 23:541-7. 1992.
4. Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the P53 gene. *Nucleic Acids Res*. 1990 Aug;18(16):4961.
5. Araujo, F. M. Análise da expressão diferencial dos genes *ID2*, *PRELP* e *SMOC2* em endométrio ectópico e eutópico de mulheres com e sem endometriose na fase proliferativa do ciclo menstrual. 2011. 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
6. Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *Fertil Steril*. 79(1):702-9, 2003.
7. Arya P, Shaw R. Endometriosis: Current thinking. *Current Obstetrics and Gynaecology*, v. 15, p.191 – 8, 2005.
8. 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.
9. Attardi LD. The role of p53 – mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genetic instability: lessons from mouse models. *Mutat Res* 2005; 569(1-2):145-57.

10. Ayres, M.; Ayres Jr, M; Ayres, D.L., Santos, A.S. 2003. BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil Mamirauá.
11. Babu KA, Reddy NG, Deendayal M, Kennedy S, Shivaji S. GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and their relationship with advanced stages of endometriosis in South Indian women. *Pharmacogenet Genom.* 2005;15(3):167-72.
12. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type P53. *Science.*1990. Aug; 249(4971):912-5.
13. Baranova H, Bothrishvilli R, Canis M, Albuisson E, Lowaczower E, Bruhat MA, Baranov V, Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Molecular Hum Reprod*, 3(9)775-780, 1987.
14. Barlow DH and Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu Rev Med* 56:345-56, 2005.
15. Batista LFZ. Mecanismos de indução de apoptose pela presença de danos ao DNA: Um estudo sobre o papel de p53 na resistência de células de glioma a agentes quimioterápicos. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
16. Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet* 38(10): 1133-1141, 2006.
17. Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered.* 1994 Sep Oct;44(5):266-70.

18. Bedone AJ, Monteiro IMU, Canfour CC, Ribeiro Filho AD. Correlação entre manifestações clínicas e achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica. *Reprodução*. 1994 Out-Dez; 9(4):219-21.
19. Bhattacharya P, Duttagupta C, Sengupta S. Proline Homozygosity in codon 72 of p53: a risk genotype for papillomavirus related cervical cancer in Indian women. *Cancer Letters* 2002; 188:207-211.
20. Bianco B, Christofolini DM, Brandes A, Lerner TG, Gonçalves-Filho RP, Souza AMB, Barbosa CP. Analysis of códon 72 polymorphism of the TP53 gene in infertile women with and without endometriosis. *Rev. Bras. Obstet*, v.33, n.1, Rio de Janeiro, 2011.
21. Bischoff F, Simpson JL. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. *Best practice & research clinical obstetrics and gynecology*. 2004;18(2):219-32.
22. Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist, A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 176:572-9, 1997.
23. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*. 2008 Jan;7(2):158-163. Epub 2007 Nov1.
24. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Rev. Cancer*, v.1, n.1, p68-76, Oct, 2001.
25. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001; 277(1-2):15-30.
26. Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS. Genetic polymorphism and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen*. 43: 100-109, 2004.

27. 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.
28. Castelli LCV. Hibridação genômica comparativa em endometriose. 2008. 111p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
29. Conforti NDT. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. (org.) Oncologia Molecular .São Paulo: Editora Atheneu, 295-305, 2004.
30. Costa IR. Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose. Dissertação (mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, Goiás, 2010.
31. Costa NB. Análise do polimorfismo do gene CYP1A1m1 em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto de uma clínica oftalmológica em Goiânia, GO. 2011. 87p. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia.
32. 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.
33. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. Ann N Y Acad Sci, 955:11-22, 2002.
34. Crawford LV, Pim DC, Lamb P. The cellular protein p53 in human tumours. Molecular Biol. Med., v.2, n.4, p.261-72, Aug, 1984.
35. Daly AK, Choleston S, Wendy G, Idle JR. Metabolic polymorphism. Pharmacol. Ther. 57: 129-160, 1993.

36. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.*, vol. 105, p.2253-2278, 2005.
37. Dentillo DB. Expressão gênica diferencial em tecido endometrial tópico e lesões endometrióticas. 2007. 83p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
38. Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *American journal of epidemiology*. Oxford Univ Press. 2003.
39. Dib LA. Análise não invasiva do fuso celular de oócitos de mulheres inférteis com endometriose e correlação com os resultados dos procedimentos de reprodução assistida. 2010. 100p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
40. Donehower LA. p53 guardian and suppressor of longevity? *Exp. Gerontol.* 2005; 40:79.
41. Dumont P, Leu JI, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. *Nature Genetics* 2003; 33: 357-365.
42. 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.
43. Falconer H, D’Hooghe T, Fried G. Endometriosis and genetic polymorphisms. *Obstet Gynecol Surv.* 62(9):616-28, 2007.
44. Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, Prives C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*, 358(6381):83-6, 1992.
45. Farquhar C. Endometriosis. *BMJ.* 3: 249-53, 2007.

46. Fedelle, L, Anchi S, Boccioloni, L. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79: 767-9.
47. Ferreira CG, Rocha JCC. *Oncologia Molecular*. São Paulo. Editora: Atheneu; 2004.
48. Ferreira LV, Valadares JC, Filho HC, Silva MAR. Transtorno disfórico pré-menstrual, conceito, histórica, epidemiologia e etiologia. *Rev Psiquiatr Clin* 2006; 33(3).
49. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The P53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989 Jun;57(7):1083-93.
50. Fontana W, Peyrottes I, Rossi C, Leblanc-Talent P, Ettore F, Namer, Bussiere F. Study of sequence of CYP1A1 gene polymorphisms and glutathione S-transferase mu 1 gene in primary breast cancers: an update with an additional 114 cases. *Mutation Research*, 403:45-53, 1998.
51. Foord OS, Bhattacharya P, Reich Z, Rotter V. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res.*, v.19, n.19, p.5191-8, Oct 11, 1991.
52. Franco YO, Franco LM. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde em Revista*. 5(9): 69-76. 2003.
53. Frare AB. Investigação dos polimorfismos GSTMI e GSTTI em mulheres com endometriose. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás -
54. Fraser IS. Recognising, understanding and managing endometriosis. *J Hum Reprod Sci*. jul–dec; 1(2): 56–64. 2008.
55. Galli E, Feijoo L. Citocromo P-450 y su importancia clínica. Revisión Actualizada. *Rev Neuro-Psiq*, 65: 187-201, 2002.

56. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: Current knowledge and perspectives. *Mutat Res.* 2005; 589(3): 192-207.
57. Gandolfi AJ, Sipes IG. Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, (Klaassen CD), pp. 88 – 126. 4th edition. New York: McGraw-Hill, Inc. 1991.
58. Gibson G, Skett P. *Introduction to drug metabolism*. 2nd ed. New York: Blackie Academic and Professional Publishers. 1994.
59. Giordano MG. *Ginecologia endócrina e da reprodução*. 1.ed. São Paulo: BYK; 1998. p.225-44.
60. Giudice LC, Kao, L. C. Endometriosis, *Lancet*, 364:1789-99, 2004.
61. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol.* 40, 243-288, 1989.
62. Gotardo MCAF. *Metaloporfirinas como modelos biomiméticos do citocromo P450 na oxidação de pesticidas*. 2006. Tese (doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
63. Goto I, Yoneda S, Yamamoto M, Kawajiri K. Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 56:3725-3730, 1996.
64. Granja F. *Avaliação do potencial de uso dos perfis genotípicos de GSTP1, GSTO1 e P53 como marcadores de predisposição ao câncer da tireoide e como preditores de resposta ao tratamento*. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2005.

65. Guimarães DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*, 84: 83-93. 2002.
66. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Canc.* 2007; 53(3):335-343.
67. 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.
68. Hadfield R. M., Manek S., Weeks D. E., Mardon H. J., Barlow D. H., Kennedy S. H. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. *Mol Hum Reprod.* 7(11):1073-8, 2001.
69. Halme J, Hammond MG, Hulka JF. Incidence of retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984; 64:151.
70. Hansen KA, Eyster KM. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*, 53(2):403-12, 2010. *Physician.* November 10; 52(11):1420-1424. 2006.
71. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent Kinases. *Cell*, v. 75, n.4, p.805-16, Nov 19, 1993.
72. Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol.* 6(12): 4650-4656, 1986.
73. Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med* 1976;16:135-38.



74. Hawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 14:77-87, 1993.
75. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600, 1995.
76. Hediger ML, Hartnett HJ, Louis GMB. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertil Steril*. November; 84(5): 1366–1374. 2005.
77. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørli T, et alli. Database of P53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1994 Sep;22(17):3551-5.
78. Honma HN, De Capitani EM, Barbeiro AS, Costa DB, Morcillo A, Zambon L. Polymorphism of the CYP1A1\*2<sup>a</sup> gene and susceptibility to lung câncer in a Brazilian population. *J Bras Pneumol*. August; Vol 35, n°8. 2009.
79. Hsieh YY, Lin CS. P53 codon 11, 72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. *International Journal of Biological Sciences*. 2(4):188-193. 2006.
80. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 193-200, 2004.
81. Jackson B and Telner DE. Managing the misplaced approach to endometriosis. *Can Fam Physician*. November 10; 52(11): 1420–1424. 2006.
82. Johnson MCP, Pinto CO, Alves ALC, Palomino AA, Fuentes AG, Boric MAS, Veja MB. P450 Arom y microambiente estrogénico en endometriosis eutópicas de mujeres con endometriosis. *Rev Méd Chile*. 2004; 132:1475-82.
83. Kalant H. Biotransformação das drogas. In: *Princípios de Farmacologia Médica*, 20-40, 1991.

84. Kamergorodsky, G. Avaliação da classificação histológica da endometriose observada em implantes de mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda [Dissertação de Mestrado em Medicina]. São Paulo, Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2007.
85. Kaufmann WK, Paules RS. DNA damage cell cycle checkpoints. *FASEB J*; 10: 238-47. 1996.
86. Kennedy S, Hadfield R, Mardon H, Barlow D. Age of onset of pain symptoms in non-twin sisters concordant for endometriosis. *Hum Reprod.*, 11:403-5, 1996.
87. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Volgestein B. Identification of p53 as a sequencespecific DNA-binding protein. *Science*, 252:1708-11, 1991.
88. Klumb CE; Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2002, 24(2): 111-125.
89. Korolkovas A, Burckhalter JH. Química farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988.
90. Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979. 278: 261-263.
91. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*. 358:15-6, 1992.
92. Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: Vieneis P, Malats N, Lag M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P (eds). *Metabolic Polymorphism and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publication, v. 148. Lyon, France, 1999. Chapter 3, p. 13-22, 1999.

93. Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M, Di Blasio AM. Analysis of the códon 72 polymorphpism of the TP53 in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(9): 651-654.
94. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 75:1-9, 2001.
95. Lehninger AL, Nelson DL; Cox, M.M. Princípios de bioquímica. 2ª ed. São Paulo: Savier. 1995.
96. Levanat S, Kappler R, Hemmerle B, Doring P, Musani, V, Komar A, Orešković S, Pavelić B, Hahn H. Analysis of alterations of the PTCH1 signaling pathway in ovarian dermoids. *International Journal of Molecular Medicine* 2004; (4):793-99.
97. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006; 13: 1027-1036.
98. Lewis DF. Cytochrome P450 structure, function and mechanism. (Taylor & Francis), 1st edition, London, Bristol, T. J. Press, 1996.
99. Li Y, Millikan RC, Bell DA, Cui L, Tse CKJ, Newman B, Conway K. Polychlorinated biphenyls, cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms, and breast cancer risk among African American women and white women in North Carolina: a population-based case-control study. *Breast Cancer Res.* 7:R12-R18. 2005.
100. Lima AP, Silva e Rosa AM, Moura MD. Concentrações de FSH, LH, estradiol, progesterona e histamina no soro, no fluido peritoneal e no fluido folicular de mulheres com e sem endometriose. *Ver Bras Ginecol Obstet*, 28(11), 2006.
101. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDC, Forones NM, Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol.* 2006; 43(1): 8-13.

102. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979 May;17(1):43-52.
103. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Análise genética em biologia molecular. In: Nader HB, editor. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.255-93.
104. Madhumalar A, Smith DJ, Verma C. Stability of the core domain of p53: insights from computer simulations. *BMC Bioinformatics*. 2008;9 Suppl1:S17.
105. 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.
106. Mangtani P and Booth M. Epidemiology of endometriosis. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 47: 84-88. 1993.
107. Masters BS, Okita RT. The history, properties, and function of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Pharmacol Ther*. 9(2):227-44. 1980.
108. Marino FFLO. Avaliação das dosagens das interleucinas 12 e 18 no sangue e no fluido peritoneal de pacientes com endometriose pélvica. 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo, 2006.
109. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7(2): 961-963, 1987.
110. May E, Kress M, Cassingena R, May P. Simian Virus 40-Transformed Cells Expressa New Species of Proteins Precipitable by Anti-Simian Virus Tumor Serum. *J Virol*. 1979; 31 (2): 472-483.

111. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18:7621-36.
112. Melin A, Sparén P, Persson I, Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod.* 21:1237-42, 2006.
113. Mengert WF. Racial contrasts in obstetrics and gynecology. *J Natl Med Assoc.* November; 58(6): 413–415.1966.
114. Meola, J. Análise da expressão gênica diferencial em endometriose. 2008 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
115. Meyer, U. Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24: 449-459. 1996.
116. 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.
117. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.
118. Miyoshi Y, Noguchi S. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. *Biomed Pharmac* 57: 471-481. 2003.
119. Modugno F. Ovarian cancer and polymorphisms in the androgen and progesterone receptor genes: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2004; 159:319–35.
120. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand;* 1993;72:560-4.

121. Moen MH, Schei B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian country. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997; 76(6): 559-562.
122. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, 242: 15-19. 2000.
123. Montellano PRO. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and biochemistry* ed.3, New York: Plenum Press 2004.
124. Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, Treloar SA, Painter JN, Missmer SA, et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update.* 14(5):447-57, 2008.
125. Moura MD, Pereira TN, Ferriani RA, Sala RMR. Avaliação do tratamento clínico da endometriose. *Clinical Treatment Evaluation of Endometriosis. Rev Brasil Ginecol e Obste* 1999;21(2).
126. Murphy ME. Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13(6): 916-920.
127. 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.
128. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol*, 10: 1-14, 1991.
129. Nora JJ, Fraser C. *Farmacogenética.* In: Nora JJ, Fraser C. *Genética médica.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 354-360. 1985.

130. Nothnick, WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril*. 76:223-31, 2001.
131. 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.
132. Olive DL, Pritts EA. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med*. 2001 Jul; 345(4):266-75.
133. Oliveira MVP. Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do gene p53 no Carcinoma Laringeo. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Goiás; 2005.
134. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutat.*, v.19, n.6, p.607-14, Jun, 2002.
135. Olson, JE, Cerhan, JR, Janney, CA, Anderson, KE, Vachon, CM, Sellers, TA. Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa women's health study. *Cancer*, 94:1612-8, 2002.
136. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Bioch Bioph Comm*, 266: 690-698, 1999.
137. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding of liver microsomes. *J Biol Chem*, 239: 2370-2384, 1964.
138. O'Neill JP. DNA damage, DNA repair, cell proliferation, and DNA replication: how do gene mutations result? *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97:11137-9, 2000.
139. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 – the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.

140. Ortega MM. Identificação das deleções e mutações do gene p53 em pacientes com mieloma múltiplo. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo; 2002.
141. Ørsted DD, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1295-301. Epub 2007 May 29.
142. Ozawa Y. Management of the pain associated with endometriosis: an update of the painful problems. *Tohoku J. Exp. Med*. 2006; 210: 175-188.
143. Özören N, El-Deiry WS. Introduction to cancer genes and growth control. In: *DNA Alterations in Cancer – genetic and epigenetic changes*. Eaton Publishing Natick 2000; p.03-35.
144. Parazzini F, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Cecchetti G. Risk factors for endometrioid, mucinous and serous benign ovarian cysts. *Int J Epidemiol* 1989; 18:108.
145. Parmigiani RB, Camargo AA. O Genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p.3-11
146. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, (C. D., KLAASSEN, org), pp. 113 – 186, 9th edition, New York, McGraw\_Hill, Inc. 2001.
147. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007; 28(6): 622-9. (Versão R12, Novembro de 2007).
148. Petta CA, Arruda M, Abrão M, Laguna C. Time elapsed from initial complaints to the diagnosis of endometriosis in a cohort of Brazilian women. *Fertility & Sterility*. P 81; 77(2) Supl.1; p. S49, 2002.



149. Podgaec S. Padrões de resposta imune em pacientes com endometriose. Tese (Doutorado). São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.
150. Pluquet O, Hainaut P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.*, 174: 1-15. 2001.
151. Prowse AH, Fakis G, Manek S, Churchman M, Edwards S, Roman A. *et al.* Allelic loss studies do not provide evidence for the “endometriosis-as-tumor” theory. *Fertility and Sterility*, v. 83(1), p. 1134-43, 2005.
152. Pugsley Z, Ballard K. Management of endometriosis in general practice: the pathway to diagnosis. *British Journal of General Practice*, June 2007.
153. Renner SP, Strick R, Oppelt P, Fasching PA, Engel S, Baumann R, Beckmann MW, Strissel PL. Evaluation of clinical parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for patients with endometriosis. *Reproduction*. 2006; 131:153–61.
154. Riachi SHMS. Imunoexpressão da enzima aromatase p450 em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda [Dissertação de Mestrado em Medicina]. São Paulo, Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2008.
155. Ribeiro Júnior, C. L. Análise do polimorfismo do gene p53 em pacientes com clínica de endometriose associado à infertilidade. Dissertação (mestrado). Goiânia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás; 2009.
156. Rocha DAM. Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. 133p.
157. Rossit, A., Conforti, Froes, N. D. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Ver. Soc. Bras. Cancer*. 3: 26-30, 2000.

158. Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21 (WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007; 15 (1): 64-69.
159. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69
160. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Rev. Biochem.*, v.73, p.39-85, 2004.
161. Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15(8): 887-898, 1997.
162. Santanam N, Murphy AA, Parthasarathy S. Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955:183-98.
163. Santos RP, Encinas F, Lasmar RB, Lotsch PF, Granjeiro JM, Penna IA. Polimorfismos nos genes MMP2, MMP13, CYP1A1, GSTM1 e EMX2 e endometriose. *Femina.* V.39, n.6: 313-317, 2010.
164. Sauer M, Bretz AC, Beinoraviciute-Kellner R, Beitzinger M, Burek C, Rosenwald A, Harms GS, Stiewe T. C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr; 36(6):1900-12. Epub 2008 Feb 11.
165. Savage SA, Burdett L, Troisi R, Douglass C, Hoover RN, Chanock SJ. Germ-Line Genetic Variation of TP53 in Osteosarcoma. *Pediatr. Blood. Cancer.* 2006 DOI 10.1002/pbc.21077.
166. Segunpta S, Harris C. p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nature Rev.*, 6: 44-55. 2005.

167. Schor E, Freitas V, Soares Júnior JM, Simões MJ, Baracat EC. Endometriose: modelo experimental em ratas. RBGO – v.21, nº 5, 1999.
168. Scott JG. Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. And Molecular Biology*, vol. 29, p.757-777, 1999.
169. Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450 – importance of tissue specificity. *Biochim. Biophys. Acta Mar*;1770(3):458-66. Epub 2006 Oct 3, 2007.
170. Siddique M, Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*. 2006; 25: 3489-3500.
171. Silva AMTC. Avaliação epidemiológica, citogenética e molecular de carcinoma da laringe. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Goiás, 2003.
172. Silva, RCPC. Análise do polimorfismo RsaI do gene receptor beta estrógeno (RE $\beta$ ) em mulheres com endometriose. Dissertação (mestrado) Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2010.
173. Simpson, J. L., Bischoff, F. Z. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 955, p. 239-51, 2002.
174. Slattery ML, Samowitz W, Murtaugh M, Sweeney C, Levin TR, Neuhausen. CYP1A1, Cigarette smoking and colon rectal cancer. *American Journal of Epidemiology*. 160:842-52. 2004.
175. Slee A, O’connor D, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*. 23: 2809-18; 2004.
176. Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng C, Hanawalt PC, Fornace AJJr. P53-mediated DNA repair responses to UV-radiation: Studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol*, 20:3705-3714, 2000.

177. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The P53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *J Urol*. 2003 Apr;169(4):1219-28.
178. Smith JM, Stubbert LJ, Hamill JD, McKay BC. The contribution of transactivation subdomains 1 and 2 to p53-induced gene expression is heterogeneous but not subdomain-specific. *Neoplasia*. 2007 Dec;9(12):1057-65.
179. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1(3): 233-140, 2001.
180. Souza SR. Análise do polimorfismo MspI do gene CYP1A1m1 (citocromo P450) e sua possível associação com a infertilidade em portadoras de endometriose. Dissertação (mestrado) Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, Goiás, 2011.
181. Stefansson H, Geirsson RT, Steinhorsdottir 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.
182. Storey A et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393, 229; 1998.
183. Sutcliffe JE, Brehm A. Of flies and men; p53, a tumor suppressor. *FEBS Lett*. 2004; 567(1): 86-91.
184. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, Hiller L, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook, T. polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 23(19): 3328-3337, 2004.
185. Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A, Mitsumoto Y, Iggo RD, Moriuchi T. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73?

Preferential selection on the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis*. 2001;22:515-7.

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

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

188. The American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine Endometriosis Classification: 1996. *Fertil Steril*; 76:817-21, 1997.

189. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril*, v.81, n.5, p.1441-6, May, 2004.

190. Thomas EJ. Endometriosis. *Br Med J*. 1993; 306:158-9.

191. Thomas EJ. Endometriosis: confusion or sense? *Int J Gynecol Obstet*. 48(2):149-55. 1995.

192. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:1325-8.

193. Treloar S. A., O'Connor D. T., O'Connor V. M., Martin N. G. Genetic influences of endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril*. 71(4):701-10, 1999.

194. Treloar SA, Zhao ZZ, Armitage T, Duffy DL, Wicks J, O'Connor DT, Martin NG, Montgomery GW. Association between polymorphisms in the progesterone receptor gene and endometriosis. *Mol. Hum. Reprod*. 2005; 11(9):641–7.

195. Ulukus, M., Ulukus, E. C., Tavmergen Goker, E. N., Tavmergen, E., Zheng, W., Arici, A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertil Steril.*, 91:687-93, 2009.
196. Valadares JC, Ferreira LV, Filho HC, Silva MAR. Transtorno disfórico pré-menstrual, conceito, história, epidemiologia e etiologia. São Paulo: *Rev. Psiq. Clín.* 2006; 33(3):117-23.
197. van Oijen MGCT, Slootweg PJ. Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene p53. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2138-2145.
198. Velebil P, Wingo PA, Xiz Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. *Obstet. Gynecol.* 1995; 86 (5): 764-769.
199. Ventolini G, Horowitz GM and Long R. Endometriosis in adolescence: A long-term follow-up fecundability Assessment. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3:14. 2005.
200. Vermeulen NPE. Role of metabolism in chemical toxicity. In: *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, (C. IOANNIDES), pp. 136-151, New York: 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, 1996.
201. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ.* Volume 306 16, january, 1993.
202. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408:307-10.
203. Zhan Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1- regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mut. Res.*, 569: 133-143, 2005.

204. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad USA* 93(26):15335-15340, 1996.
205. Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis – associated infertility. *J Reprod. Med* 1989;34:41-6.
206. Willard H. Genética e câncer. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FN. *Genética médica* Thompson & Thompson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p. 274- 293.
207. Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, 81:121-131, 2000.
208. Witz, C. A. Pathogenesis of Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.*, 53(suppl 1): 52-62, 2002.
209. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular Cell*, v.2, n.3, p.305-16, Sep, 1998.

## ANEXOS

### Anexo I:

**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 II:**

**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:**

\_\_\_\_\_

**Anexo III:**

**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:

---