



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética  
**MESTRADO EM GENÉTICA**



---

**Análise do polimorfismo *MspI* do gene *CYP1A1m1*  
(*Citocromo P450*) em mulheres com endometriose**

---

**Suelene Ribeiro de Souza**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Karina Verolli de O. Moura**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Bárbara Mariotto Bordin MSc.**

**Goiânia-Goiás**  
**2012**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética  
**MESTRADO EM GENÉTICA**



---

**Análise do polimorfismo *MspI* do gene *CYP1A1m1*  
(*Citocromo P450*) em mulheres com endometriose**

---

**Suelene Ribeiro de Souza**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética MGENE da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Genética.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kátia Karina Verolli de O. Moura**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Bárbara Mariotto Bordin MSc.**

**Goiânia-Goiás**  
**2012**

S729a Souza, Suelene Ribeiro de.

Análise do polimorfismo *MspI* do gene *CYP1A1m1* (Citocromo P450) em mulheres com endometriose [manuscrito] / Suelene Ribeiro de Souza. – 2012.

96 f. : il. colors.

Bibliografia: [70]-[75]

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

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

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Bárbara Mariotto Bordin MSc.

Inclui lista figuras, tabelas, abreviaturas.

Inclui Anexos.

1. Genética. 2. Endometriose. 3. Infertilidade feminina. 4. Polimorfismo *MspI*. 5. Gene *CYP1A1*. I. Título.

CDU: 575.17:618.14-002(043.3)



**PUC  
GOIÁS**

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

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 27 DE MARÇO DE 2012 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM CONCEITO.....**

Dr.ª Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura  
(presidente-orientadora)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis  
(membro interno)

Prof.ª Dr.ª Daniela de Melo e Silva  
(membro externo)

## **DEDICATÓRIA**

Tudo na vida necessita ser feito com amor...  
Ao mesmo tempo em que o amor nos deixa  
sensíveis, nos torna mais fortes...  
Dedico essa dissertação ao meu esposo,  
Antoninho;  
Aos meus filhos, Râmila e Reiner; Por todo o  
carinho, incentivo, apoio e compreensão;  
Pelos momentos que outrora não podemos  
desfrutar.

“Depois de algum tempo a gente aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. Começa a aprender a construir todas as nossas estradas no hoje, pois o terreno do amanhã é incerto demais para planos e o futuro tem costume de cair em meio ao vão.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias e que não importa o que se tem na vida, mas QUEM se tem na vida, e que os bons amigos são a família que nos foi permitido escolher.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas que somos responsáveis por nós mesmos.

Aprende que não importa onde já chegamos, mas onde estamos indo. Mas se não soubermos nosso destino, qualquer lugar serve.

Aprende que maturidade tem mais a ver com as experiências que tivemos e o que aprendemos com elas do que com quantos aniversários celebramos e que há mais de nossos pais em nós do que possamos imaginar.

Aprende que quando se está com raiva, tem-se o direito de estar com raiva, mas isto não nos dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não nos ama da forma que a gente quer que ame não significa que não nos ama com todo seu ser.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes é preciso perdoar a nós mesmos.

Aprende que com a severidade com que julgamos seremos um dia condenados.

E a gente aprende a realmente suportar... que somos realmente fortes e podemos ir muito mais longe... depois de pensar que não podemos mais.

E que realmente a vida tem valor e temos valor diante da vida.”

William Sheakespeare

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial...

Ao meu marido Antoninho pela nossa cumplicidade e carinho, pelo apoio incondicional dedicado a mim, pelo incentivo e paciência...;

Aos meus filhos: Reiner e Râmila, aos meus enteados: Luciana, Flávio e Renato por todo o amor, apoio, carinho, compreensão e incentivo, sem os quais eu não chegaria até aqui...;

Aos meus familiares, meu pai Jair e sua esposa Maria, meus irmãos: Rosimeire, Mara Rizzia, Rosimaire, Jaime, Jair Filho, Letícia e Vinícius agradeço pela força que sempre me deram...;

Às mulheres que, como pacientes ou controles, que constituíram os dados da pesquisa e tornaram possível esta investigação...;

Os médicos integrantes do corpo clínico da Clínica Fértil Diagnósticos em Goiânia;

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Daniela Melo, Dr<sup>o</sup>. Flávio Aires, Dr<sup>o</sup>. Wagner Gouveia, Dr<sup>a</sup>. Mariana Telles, D<sup>a</sup> Vera Sad, Dr<sup>a</sup>. Kátia Karina do curso de Mestrado em Genética pelo conhecimento transmitido e ajuda durante todas as etapas do Mestrado; agradeço especialmente ao professor Dr<sup>o</sup>. Aparecido Divino (Peixoto) por conceder a execução deste trabalho no laboratório Replicon...;

A todos do laboratório Replicon, Damiana, Cristiano, Eduardo, Constanza e todos da iniciação científica pela atenção, confiança e ajuda a mim prestada, nos momentos em que necessitava...;

A todos os meus colegas e amigos do curso de Mestrado em Genética pelo carinho e grande amizade; em especial a Ariane Frare, Flávia Aleixo, Rita de Cássia, Iasmim Ribeiro...;

Durante a graduação muitos colegas passam, porém poucos amigos ficam. Quero fazer um agradecimento especial aos meus amigos verdadeiros que mesmo de longe me apoiaram: Rodrigo Santos, Kárita Antunes, Luana Cristina, Carla Balestra, Suellen Corrijo, Luciana Marques, Raquel Carneiro, Rodrigo Roncato e em especial aos técnicos de laboratório Roberto Carlos e a Dalva. Amigos o apoio de vocês foi fundamental;

À Co-orientadora Bárbara Mariotto pela ajuda no processamento de algumas amostras. E também pelas leituras prévias da dissertação;

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Kátia Karina pela oportunidade de me integrar em seu grupo de pesquisa e prosseguir meus estudos, por demonstrar confiança no meu trabalho quando aceitou me orientar, por toda paciência, atenção, orientação, interesse e respeito à minha vontade quando quis trabalhar nesta área;

Ao final desta etapa de trabalho recordo de muitos que me ajudaram, pessoas que cruzaram meu caminho e que deixaram marcas. Cada um de vocês é um pouco da minha história... É impossível, entretanto, nominar todas as pessoas que me ajudaram nessa jornada, minhas desculpas aos que não foram citados, mas minha eterna gratidão a todos que possibilitaram a execução desse trabalho. Sem vocês seria muito mais difícil a realização desta dissertação. Por isto OBRIGADA a todos;

Á Deus, por ter me dado uma vida tão cheia de bons momentos e alegrias.

“De tudo ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que precisamos continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Portanto, devemos:  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro.. “

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	18
ABSTRACT .....	19
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.2 – Hábitos sociais e dados geográficos .....	24
1.2.1 – Idade .....	24
1.2.2 – Etnia .....	25
1.2.3 – Estado civil .....	25
1.2.4 – Fumo .....	25
1.2.5 – Escolaridade.....	26
1.2.6 – Atividades físicas .....	26
1.3 – Genética .....	26
1.4 – Antecedentes familiares .....	27
1.5 – Diagnóstico de Endometriose.....	27
1.6 – Sintomas e Endometriose .....	28
1.7 – Morfologia.....	29
1.8 – Infertilidade.....	31
1.9 - Agentes Xenobióticos .....	33
1.10 - Genes de metabolização .....	34
1.10.1 - Glutathione S-transferase - genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	35
1.10.2 - Gene <i>P53</i> .....	36
1.10.3 - <i>Citocromo P450 (CYP)</i> .....	37
2 – JUSTIFICATIVA .....	44
3 – OBJETIVOS .....	45
3.1 - Objetivos Específicos .....	45
4 – MATERIAL E MÉTODO .....	46
4.1- Extrações de DNA genômico .....	46
4.2- Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	46
4.3 - Digestão Enzimática .....	48
4.4 – Análise Estatística .....	51

5 – RESULTADOS .....	53
6 – DISCUSSÃO .....	65
7- CONCLUSÃO .....	69
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
ANEXOS .....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Locais mais comuns dos focos de endometriose (Fonte: brnoticias. 2010) .....	20
Figura 02: Localização da Endometriose dentro da pelve e do abdômen (Fonte: Ramos, 2010).....	23
Figura 03: Conteúdo achocolatado do endometrioma (Fonte: Kondo, W. 2010) .....	30
Figura 04: Endometriose em ligamento útero-sacro esquerdo e em região retro cervical .....	32
Figura 05: Foto de Endometriomas (endometriose nos ovários). Fonte: Kondo, W. 2010. ....	33
Figura 06: Cromossomo: 15q; Localização: 22-24. Fonte: NCBI.....	41
Figura 07: Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas relativas ao primer CYP 1A1 para a detecção do polimorfismo <i>CYP1A1</i> T → C detectado pela enzima <i>MspI</i> , onde M = marcador de peso molecular (100pb invitrogen). Linha 1: homocigoto para o alelo selvagem (W1/W1). Linha 2: heterocigoto (W1/m1). Linha 3: homocigoto para o alelo selvagem. Linha 4: homocigoto para o alelo mutante (m1/m1).....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela I – Diagnósticos para identificação de estromas ou glândulas endometriais. ....	28
Tabela II – A evolução dos <i>CYPs</i> tempo milhões de anos. ....	38
Tabela III- Reagentes utilizados no processo da PCR do gene <i>CYP1A1</i> e suas respectivas concentrações. ....	47
Tabela IV – Iniciadores e condições de amplificação para o gene <i>CYP1A1</i> e o <i>ZFX/y</i> . ....	48
Tabela V - Reagentes utilizados no processo da digestão enzimática <i>MspI</i> ( <i>CYP1A1m1</i> ) e suas respectivas concentrações. ....	49
Tabela VI – Iniciadores e condições de amplificação para o gene <i>CYP1A1m1</i> . ....	49
Tabela VII – Iniciadores e condições de amplificação do <i>primers p53-PRO</i> e tamanho esperado do fragmento. ....	49
Tabela VIII - Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do <i>p53-PRO</i> e suas respectivas concentrações. ....	50
Tabela IX – Iniciadores e condições de amplificação do <i>primers p53-ARG</i> e tamanho esperado do fragmento. ....	50
Tabela X - Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do <i>p53-ARG</i> e suas respectivas concentrações. ....	51
Tabela XI: Comparação das variáveis das médias idades das pacientes com endometriose e grupo controle (sem endometriose). ....	53
Tabela XII - Distribuição das frequências genóticas para o gene <i>CYP1A1m1</i> caso (endometriose) X grupo controle ....	54
Tabela XIII - Distribuição das frequências alélicas para o gene <i>CYP1A1m1</i> caso (endometriose) X grupo controle ....	54
Tabela XIV – Distribuição da frequência dos genótipos do gene <i>CYP1a1m1</i> comparando com a classificação da endometriose (Grau I/Grau II / ou Grau III/Grau IV). ....	55
Tabela XV – Distribuição da frequência dos alelos do gene <i>CYP1a1m1</i> comparando com a classificação da endometriose (Grau I/Grau II / ou Grau III/Grau IV). ....	55
Tabela XVI - Frequência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) comparando com o grupo controle. ....	56

Tabela XVII - Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (endometriose) (pacientes férteis) e o uso de anticoncepcional comparando com o grupo controle. ....	57
Tabela XVIII - Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) que praticam atividade física comparando com o grupo controle.....	58
Tabela XIX - Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) e o tabagismo comparando com o grupo controle. ....	59
Tabela XX - Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) e o etilismo comparando com o grupo controle. ....	60
Tabela XXI – Distribuição das freqüências genotípicas para o gene da p53 caso (endometriose) X grupo controle .....	60
Tabela XXII - Distribuição das freqüências alélicas para p53 caso (endometriose) X grupo controle .....	61
Tabela XXIII - Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando com o gene p53. ....	61
Tabela XXIV –Freqüência genotípica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando com a cor da paciente.....	62
Tabela XXV – Freqüência alélica do gene <i>CYP1A1m1</i> entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando quanto à cor da paciente. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – Nucleotídeo e contendo adenina

AHH - Aril Hidrocarbono Hidroxilase

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

BPED - benzopireno diol epóxido

°C – graus Celsius

C – Nucleotídeo e contendo citosina

CA-125 - Marcador para diagnosticar a endometriose

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Goiás

cDNAs - DNA complementares

cm – Centímetro

C-terminal – Extremidade da cadeia polipeptídica que apresenta um grupo carboxila livre

CO - Monóxido de carbono

CO<sub>2</sub> - Dióxidos de carbono

COX2 - Ciclooxygenase do tipo 2

*CYP - Citocromo P450*

*CYP1A1 - Citocromo P450, subfamília 1A, polipeptídeo 1*

*CYP1A1m1 - Citocromo P450, subfamília 1A, polipeptídeo 1*

*CYP 19 - Citocromo P450, gene19*

*CYP2 - Citocromo P450, subfamília 2A*

*CYP3 Citocromo P450, subfamília 3A*

*CYP 17 - Citocromo P450, gene17*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxinucleotídeos trifosfatados/ didesoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

E1 – Estroma extra-hepática

Fértil – Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana

FIV - fecundação *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

G – Nucleotídeo contendo guanina

G1 - Intervalo (gap) entre a mitose que originou a célula e a fase S

G2 - Intervalo (gap) entre a fase S e a mitose que dará origem a duas células filhas

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

GSTs - enzimas Glutathionas-Transferases

GSTM1- Glutathione S-transferase M1

GSTT1- Glutathione S-transferase theta 1

HE - hematoxilina e eosina

IL - interleucina

Kb - kilobases

LUF - síndrome de luteinização do folículo não roto

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

M - Fase de mitose

mm - milímetros

MMPs - matrix metaloproteinases

MspI - Polimorfismo do gene receptor de estrogênio

m1 - Citosina

M1/m1- Citosina/Citosina

NaCl: Cloreto de Sódio

NAD(P)H – (Difosfato de) dinucleótido de adenina e nicotinamida

NATs - N-acetil-transferases

OMS - Organização Mundial da Saúde

pb – pares de bases

PAHs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

PCR- Reação em Cadeia da polimerase

PGE2 - prostaglandina E2

PROGINS – Polimorfismo de receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP)

PUC – Pontifícia Universidade de Goiás

P53 – Proteína p53

p53 – gene supressor tumoral

P450 - aromatase P450

RE – Receptor de estrogênios

Replicon - Núcleo de Pesquisas Replicon

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RNAs- Ácidos ribonucléicos

RPM – rotações por minuto

mRNA - Ácido Ribonucléico Mensageiro

s – segundo

S - Fase de síntese do DNA

T – Nucleotídeo contendo timina

Taq – *Thermus aquaticus*

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

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

U – Unidade de atividade enzimática

µg/mL - microgramas/ mililitros

$\mu\text{L}$  – microlitros

$\mu\text{m}$  - micrômetro

V/cm - Velocidade/ centímetro

VDS - sistema de Vídeo Documentação

W1 - Timina

W1/W1 – Timina/Timina

W1/m1- Timina/Citosina

$\chi^2$  – Qui quadrado

1p - braço curto do cromossomo 1

1p13.1 - braço curto do cromossomo 1, banda 13 e subbanda 1

5p - braço curto do cromossomo 5

6q - braço longo do cromossomo 6

22q11.2 - braço longo do cromossomo 22, banda 11 e subbanda 2

11q22-237 - braço longo do cromossomo 11, banda 22 e subbanda 237

5q22-24 - braço longo do cromossomo 15, banda 22 e subbanda 24

22q - braço longo do cromossomo 22

## RESUMO

Endometriose é uma enfermidade que afeta entre 10 e 15% das mulheres em idade reprodutiva. Caracterizada pela presença de tecidos semelhante a do endométrio, idênticos aos da cavidade uterina fora do útero. Apesar de algumas definições especificarem que o tecido ectópico funcional é sensível à ação de hormônios e seus mecanismos etiopatogênicos provavelmente envolvem anomalias imunológicas. O grau do comprometimento da endometriose é baseado no sistema proposto pela American Society for Reproductive Medicine (1985), com base nos achados de laparoscopia. Observa-se nos últimos 10 anos a crescente tendência em se utilizar um conjunto de marcadores para detectar alterações induzidas por xenobióticos. Inúmeros polimorfismos genéticos têm sido citados para o gene *CYP1A1*. O gene codifica enzimas da fase I envolvidas na desintoxicação no metabolismo de xenobióticos, codifica uma isoenzima que catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em produtos fenólicos e epóxidos. Mapeado no e localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22-24). O objetivo do estudo foi analisar frequência o polimorfismo do gene *MspI CYP1A1m1* com a endometriose. Foram analisadas 52 amostras de sangue periférico de mulheres com endometriose comprovadas por laparoscopia (FÉRTILE) com idades 25 a 35 anos mulheres e 42 amostras de mulheres sem endometriose com idades 25 a 57 anos (grupo controle). A análise molecular por meio da técnica da PCR (*polymerase chain reaction*). Constatou-se uma associação estatisticamente significativa ( $P= 0,039$ ) entre a endometriose e o alelo polimórfico *m1* nas mulheres com endometriose (32,70%) quando comparadas ao grupo controle 14,29%. Concluiu-se que o polimorfismo *m1* correlaciona-se com a endometriose e que os polimorfismos *W1/m1* e *m1/m1* estão mais freqüentes nas pacientes com infertilidade e com quadro clínico mais severo da endometriose.

Palavras-chave: Endometriose; Gene *CYP1A1*; Polimorfismo *MspI*; Infertilidade.

## ABSTRACT

Endometriosis is a disease that affects between 10 and 15% of women of reproductive age. Characterized by the presence of tissue resembling the endometrium similar to the uterine cavity outside the uterus, although some definitions specify that the ectopic tissue functional and sensitive to the action of hormones and their etiopathogenic mechanisms probably involve immunological abnormalities. The degree of involvement of endometriosis is based on the system proposed by the American Society for Reproductive Medicine (1985), based on the findings of laparoscopy. It is observed in the last 10 years, an increasing tendency to use a set of markers to detect changes induced by xenobiotics. Several genetic polymorphisms have been cited for the *CYP1A1* gene, indicating a lack of functional protein that can cause an increase or a decrease in metabolic activity. The *CYP1A1* gene encode the phase I enzymes involved in detoxification of estrogen metabolism, encodes an isoenzyme that catalyzes the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in phenolic compounds and epoxides. Mapped and located on the long arm of chromosome 15 (15q22-24). The aim of this study was to analyze the gene polymorphism frequency *MspI CYP1A1m1* with endometriosis. We analyzed 52 samples of peripheral blood of with endometriosis documented by laparoscopy (FÉRTILE) aged 25 to 35 women and 42 samples from women without endometriosis aged 25 to 57 years (control group). Molecular analysis by PCR (polymerase chain reaction). There was a statistically significant association ( $P = 0.039$ ) between endometriosis and *CYP1A1m1* polymorphic allele in women with endometriosis (32.70%) and compared with the control group 14,29%. We conclude that the gene polymorphism *CYP1A1m1* correlates with endometriosis and polymorphisms are W1/m1 and m1/m1 more frequent in patients with infertilit and with more severe clinical picture of endometriosis.

Keywords: Endometriosis; Gene *CYP1A1*, *MspI* Polymorphism; Infertility.

## 1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma enfermidade que afeta a população feminina na idade reprodutiva. Esta patologia é caracterizada pela presença de tecidos de estrutura semelhante a do endométrio, (glândulas endometriais e ou estromas) idênticos aos da cavidade uterina fora do útero e sensível à ação de hormônios. A endometriose afeta entre 10 e 15% das mulheres em idade reprodutiva e seus mecanismo etiopatogênicos provavelmente envolvem anomalias imunológicas (Figura 01) (Abrão, 2007; Podgaec *et al*, 2007; Guo & Wang, 2006).

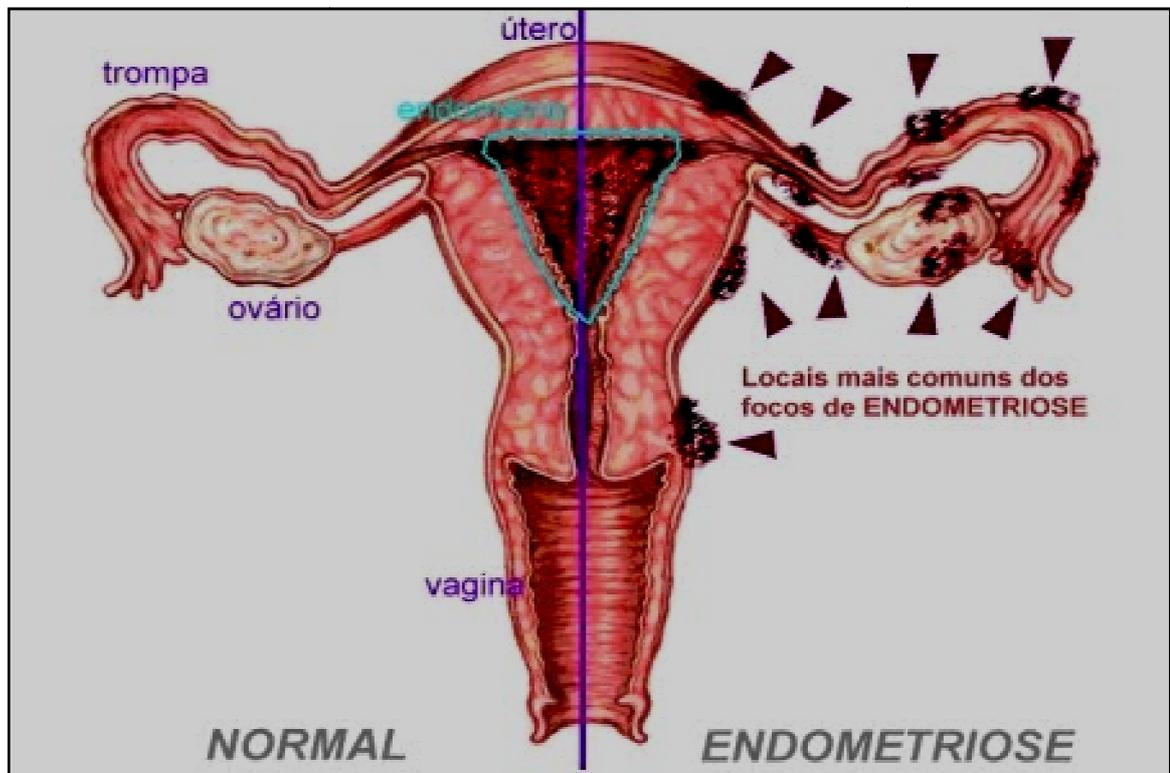


Figura 01 - Locais mais comuns dos focos de endometriose (Fonte: brnoticias. 2010)

O local mais comum de encontro da endometriose é na pelve, podendo ser encontrada em outros locais como: no sistema nervoso central, tórax, trato urinário, trato gastrintestinal, extremidades e tecido celular cutâneo, no saco de Douglas (que fica atrás do útero), no septo reto-vaginal (tecido entre a vagina e o reto), trompas, ovários, bexiga e ligamentos do fígado, baço, intestino, coração, etc. Tendo como principais sintomas: dismenorréia, dispareunia, dor pélvica e a infertilidade (Podgaec *et al*, 2007; Abrão, 2000).

Esta patologia pode ser diagnosticada com o estudo histopatológico, porém a laparoscopia o padrão ouro para diagnosticar a endometriose (Abrão, 2007). Existem diversas teorias para explicar a origem da endometriose, a mais aceita é a de Sampson (1927).

Os primeiros estudos a respeito da endometriose foram realizados no século passado por Sampson em 1927, a explicação para a compreensão da patogênese desta doença foi através da teoria do transporte celular, de onde se deu o início a uma série de publicações de Sampson. Com base na sua experiência clínica, Sampson propôs que o sangue menstrual sai a partir da regurgitação menstrual retrógrada das trompas para a cavidade peritoneal, contendo células endometriais viáveis que podem ser transplantadas nos sítios ectópicos. Além do transporte direto da disseminação transtubária, também pode ocorrer por disseminação do tecido endometrial através do sangue ou dos canais linfáticos para outros órgãos ou de cicatrizações cirúrgicas (Bankowaki, 2006; Kistner, 1983).

Ainda que seja uma das doenças ginecológicas mais habituais, desconhece-se a causa exata e a patogênese da endometriose. A patogênese tem sido discutida há muito tempo, sendo duas as principais teorias que procuram explicar sua fisiopatologia: 1ª) o desenvolvimento *in situ* por metaplasia celômica; e 2ª) o desenvolvimento por disseminação do endométrio pelas tubas uterinas (menstruação retrógrada) e pelas vias linfáticas ou vasculares (Kistner, 1983).

Segundo Cotran (2000), são várias as teorias para a definição da patogenia da endometriose, porém, nenhuma delas consegue explicar todas as diferentes localizações dos focos de endometriose. Na teoria da Implantação intra-operatória está aparecimento da endometriose nas cicatrizes de histerectomias e episiotomia podendo ocorrer à implantação de fragmento durante a cirurgia.

Na teoria Mulleriana a endometriose se origina através da transformação de restos embrionários, baseado em estudos histológicos e na localização das lesões nas regiões anatomicamente adjacentes aos ductos de Wolff ou de Muller (Russel, 1899).

A teoria da Disseminação Linfática e Hematógena advêm da ocorrência de endometriose em sítios distantes, como pulmões e rins. Esse conceito é sustentado pela observação de endometriose pulmonar ocorrente exclusivamente em mulheres submetidas à cirurgia uterina. A presença de endometriose em linfonodos é

compatível com disseminação linfática semelhante. A teoria da Metaplasia Celômica descreve que a endometriose procede do revestimento da cavidade peritoneal (metaplasia celômica do epitélio), tendo em vista o potencial desse tecido nas mulheres (Cotran, 2000).

A teoria da metaplasia celômica baseia-se nos estudos da embriogênese. Russell em 1899 descreveu que o aparecimento de glândulas no ovário pode ser de origem dos restos celulares dos condutos de Muller. No início do século, Robert Mayer (1919) apresentou a teoria da metaplasia celômica, assegurando que as células peritoneais são embriologicamente derivadas do epitélio celômico, as quais são totipotenciais e retêm a capacidade de produzir tecido endometrial quando devidamente estimuladas. Esses estímulos podem ser hormonais, inflamatórios ou de outra natureza não conhecida (Kistner, 1983).

A capacidade do tecido mesenquimal celômico embriogênico contribui para a formação de diversos tecidos do trato genital feminino e do peritônio. Localizadas em sítios extra-uterinos, as células desses tecidos retêm algumas de suas primitivas multipotencialidades, sofrendo metaplasia em determinadas circunstâncias ou diante de determinados estímulos desenvolvendo a endometriose. De acordo com os autores nenhuma das duas teorias explica completamente a origem da endometriose, acreditam que pode ocorrer uma combinação dos eventos na formação da endometriose extra-pélvica. Os mecanismos podem ser verdadeiros e inseparáveis, com o tecido endometrial estimulando a replicação celular (metaplasia) ao ser transportado de alguma maneira (transporte direto ou pelos vasos linfáticos e vasculares) para um tecido susceptível (Steck & Helwig, 1965).

Um dos motivos da teoria da Implantação Menstrual Retrógrada é a ocorrência da menstruação retrógrada emitida através das trompas uterinas em 90% das mulheres e que a endometriose é uma doença não cancerosa, devido o tecido semelhante ao endométrio se desenvolver fora da cavidade uterina, mas pode ocorrer em qualquer parte do corpo, ou seja, de glândulas e estromas endometriais que são encontrados em vários outros locais, mas sobre tudo no miométrio e estruturas da cavidade pélvica (Faria, 1999).

A endometriose interna ou adenomiose ocorre principalmente entre mulheres que já engravidaram. Os sintomas mais comuns são dismenorréia, ou seja, menstruação dolorosa e hemorragia genital anormal fluxo menstrual abundante ou

hemorragia intermenstrual. A interna, determinada como adenomiose, sendo distinguida pelo crescimento do tecido endometrial benigno no miométrio. A externa divide-se em: a) endometriose pélvica, conceituada como a presença de implantes de tecido endometrial em todos os locais anatomicamente próximos do útero (exemplo: trompas e ovários, peritônio local); e b) endometriose extra-pélvica, referida aos implantes endometrióticos encontrados em locais remotos, como no sistema nervoso central, tórax, trato urinário, trato gastrintestinal, extremidades e tecido celular cutâneo (Figura 02) (Faria, 1999; Jubanyik & Comite, 1997).

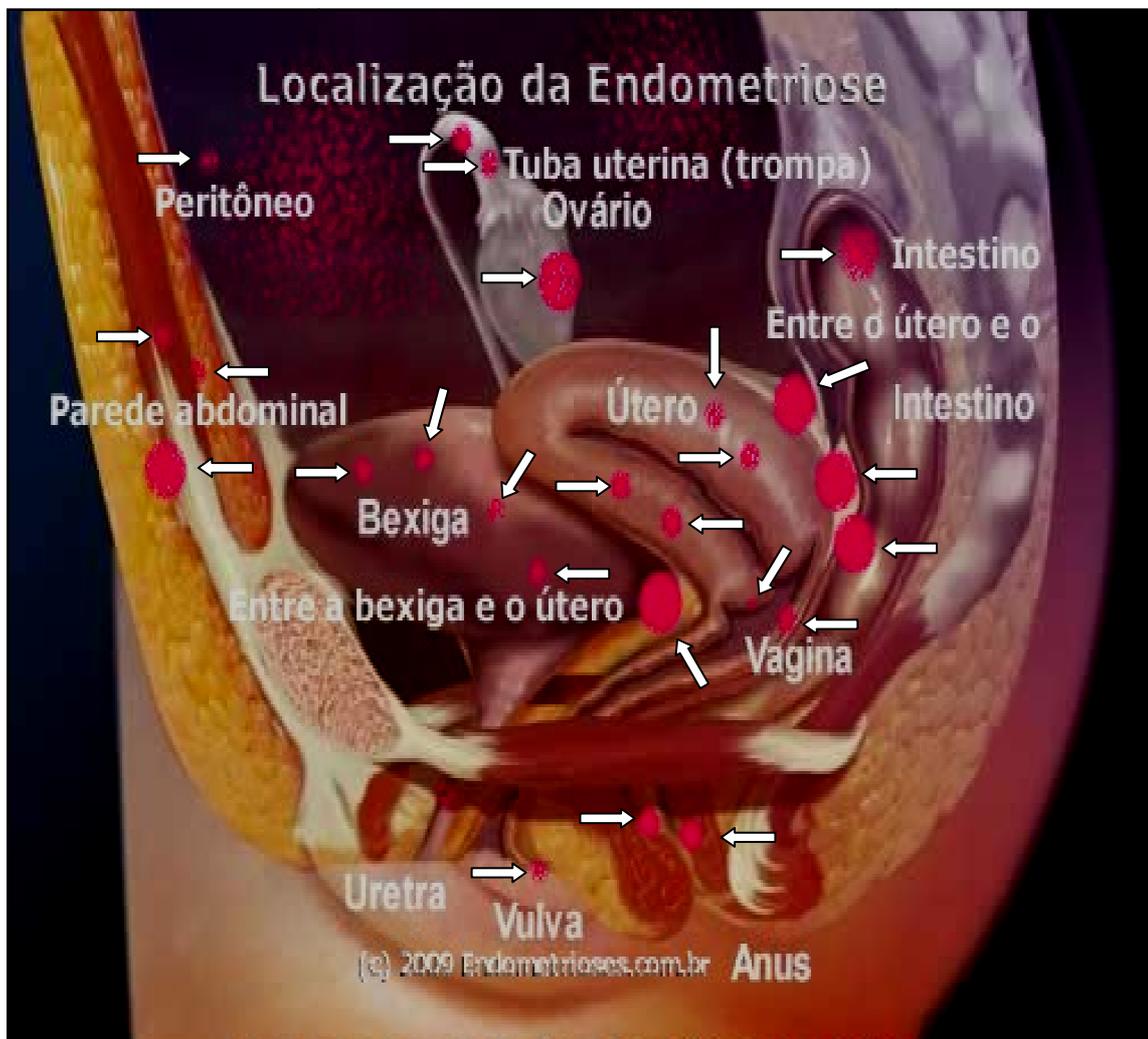


Figura 02: Localização da Endometriose dentro da pelve e do abdômen (Fonte: Ramos, 2010)

A endometriose incisional está relacionada com procedimentos cirúrgicos que transgridem a cavidade uterina, permitindo o tecido endometrial ser transplantado para as cicatrizes cirúrgicas. O tecido endometrial dos estágios iniciais da gravidez é transplantado com mais facilidade do que o endométrio de uma gravidez a termo, provavelmente devido à menor capacidade de implantação da decídua do final da

gestação. Uma ocorrência maior de endometriomas foi diagnosticada após histerotomias realizadas na primeira metade da gestação (Rani *et al*, 1991; Gordon & Krishna, 1989).

O sistema de classificação da endometriose baseia no tamanho na profundidade dos implantes peritoneais e ovarianos, na presença, na extensão e no tipo de aderências anexais, e grau da obliteração do fundo do saco. A endometriose é classificada em três graus: leve, moderado e grave. Na leve os ovários apresentam implantes em superfície, sem a presença de endometriose e retrações ou cicatrizes, assim como aderências pré-ovarianas (Donadio, 2001).

A endometriose é classificada pela Sociedade Americana de Fertilidade (*American Fertility Society*, 1985) como, mínima apresentando presença de manchas peritoneais; leve apresentando manchas peritoneais extensas e ou aderências; moderada apresentando presença de endometriomas profundos e severa com a obliteração do fundo de saco posterior.

A freqüência da endometriose tem sido citada os índices de 5% a 36%. Acredita-se que a recente incidência alcance 10% das mulheres em idade reprodutiva. Sendo considerada como a terceira principal causa de hospitalizações ginecológicas e a principal indicação de histerectomias nos Estados Unidos (Eskenazi & Warner, 1997).

## **1.2 – Hábitos sociais e dados geográficos**

### **1.2.1 - Idade**

Há consenso de que a idade não ressalta relação com a gravidade na doença da endometriose, partindo-se do princípio que os estrogênios têm importância maior no desenvolvimento dessa doença, fica clara a percepção de que o período reprodutivo da mulher é de particular interesse. Observou-se que a patologia em mulheres varia de 12 a 80 anos, com uma idade média de diagnóstico em torno de 28 anos de idade (Pritts & Taylor, 2003; Eskenazi & Warner, 1997).

Estudo com 244 pacientes feito no HC-FMUSP no período de 1992 a 1999 mostrou que a idade média era entre 30 e 34 anos, sendo que o início das sintomatologias se deu há mais de 05 anos antes do diagnóstico em 36,41% dessas pacientes (Abrão, 2000).

Segundo as pesquisas de Hadfield e colaboradores (2001) a idade no período da análise, indicando que o tempo médio de 11,7 anos nos Estados Unidos e de 7,9 anos no Reino Unido entre o começo dos sintomas e do diagnóstico de endometriose, podendo assim prever uma possibilidade de diagnosticar a doença mais precoce nesses casos.

### **1.2.2 – Etnia**

Vários estudos vêm buscando comprovar a participação da raça como fator de risco para a endometriose. O que se tem observado é uma grande polêmica entre as mais diversas pesquisas, Kirshon *et al* (1989) e Houston, Noller & Melton (1988) afirmaram não perceber diferença na incidência entre as diversas raças.

### **1.2.3 – Estado civil**

O estado civil é outro aspecto bastante polêmico como parâmetro de incidência para a endometriose. É de se imaginar, entretanto, que as pacientes casadas ou em vida consensual (com vida conjugal estável) venham mais a procura do serviço médico devido à queixa de infertilidade, do que mulheres sem vida conjugal estável. Embora haja trabalhos que recuse este entendimento (Parazzini *et al*, 1989).

### **1.2.4 – Fumo**

De acordo com Cramer e colaboradores (1986), uma mulher que fuma mais de vinte cigarros por dia tem uma propensão de apresentar níveis séricos de estrogênio reduzidos, o que serviria deste modo como agente protetor da endometriose, o os estudos apontaram que as mulheres que iniciaram o hábito do tabagismo antes dos dezessete anos, fumando vinte cigarros por dia, como tendo um risco significativamente menor de apresentar endometriose quando comparadas com as não fumantes. Por outro lado, Parazzini e colaboradores (1989) em suas pesquisas, não encontraram diferença entre fumantes e não fumantes quanto à incidência de endometriose ovariana.

### 1.2.5 – Escolaridade

A respeito à escolaridade, estudos europeus apontam a existência de uma maior incidência de endometriose de 30% em mulheres que possuem o segundo grau e de 27% com o nível superior. Em outros trabalhos indicam valores semelhantes, mesmo quando estas pesquisas foram realizadas em instituições públicas, de onde o grau de escolaridade entre as pacientes com endometriose é mais baixo, fazendo com que seja uma grande possibilidade de que o fator de estresse seja o agente causal da doença (Abrão, 2000).

### 1.2.6 – Atividades físicas

A realização regular de exercícios físicos parece benévola para diminuir os índices de endometriose, quando praticados precocemente. A redução de estradiol, devido à liberação de beta-endorfinas que inibem o GnRH (Hormônio de liberação das gonadotrofinas) e conseqüentemente o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, e a melhoria causada no sistema imunológico pela atividade física, parecem esclarecer a menor incidência dessa doença em mulheres que praticam exercícios físicos de modo regular (Velebil *et al*, 1995).

A prática de atividades físicas diárias beneficia o sistema imunológico e por isso, o corpo elimina com facilidade os focos endometrióticos. Outro fator importante relacionado à atividade física é a redução da secreção do estrogênio, o que pode favorecer a desenvolvimento da doença (Lorenatto *et al.*, 2002).

## 1.3 – Genética

O risco de a mulher ter endometriose é sete vezes maior em familiares de primeiro grau de mulheres com endometriose, a maior ocorrência da doença em parentes de primeiro grau em mulheres é de 4,3 a 6,9 % com a doença e de 0,6 a 2,0 % em mulheres que não possuem a doença e parece não existir nenhuma associação com as mutações genéticas, embora alguns autores fizessem menções a polimorfismos específicos (Arvanits *et al*, 2001, Kennedy *et al*, 1995).

De acordo com Guo e colaboradores (2004) a origem da endometriose foi baseada em estudos familiares, os quais tiveram uma maior ocorrência da doença

em parentes de primeiro grau em mulheres com a doença. No entanto, a imensa quantidade de alterações moleculares e celulares detectadas dá a entender de uma origem poligênica da doença. O autor relata que o aparecimento do fenótipo pode ser devido às interações entre os produtos da expressão de determinados alelos envolvidos de genes específicos. Ainda que provavelmente o sítio peritoneal de mulheres susceptíveis à endometriose favoreça as modificações da integridade genômica das células endometriais que resultam do efluente menstrual e deste modo, originando o aparecimento das lesões.

#### **1.4 – Antecedentes familiares**

Os trabalhos apontam a frequência de familiares de primeiro ou de segundo grau em portadoras de endometriose, podendo haver a influência em relação ao aumento da incidência em algumas pacientes. E que quanto identificar um fator familiar ou mesmo genético que predisponha a mulher a ter endometriose é algo difícil pelas próprias limitações de diagnósticos (Velebil *et al*, 1995).

Kennedy e colaboradores (1995) analisaram um grupo de 230 mulheres portadoras de endometriose, o resultado encontrado desde estudo ressaltou que 19 casos foram de mãe e filha portadoras da doença, e 16 pares de irmãs e um caso de irmãs gêmeas portadoras de endometriose. Seja por fatores genéticos ou por hábitos de vida semelhantes, ainda que não apresente uma interação mendeliana clara, a grande maioria dos pesquisadores acredita que o componente familiar seja de origem poligênica e multifatorial (Gianetto & Feyles, 2003).

#### **1.5 – Diagnóstico de Endometriose**

O diagnóstico histológico é fundamentado na identificação de glândulas endometriais de características separadas por estroma endometrial dentro de tecido conectivo fibroso ou de músculo esquelético, nas áreas de endometriose crônica ativa com fibrose e nas áreas de hemorragia focal, e do mesmo modo no tecido endometrial ectópico responde aos estímulos hormonais. Nas hemorragias dentro do foco resultam em processo inflamatório com infiltração de histiócitos e macrófagos carregados de pigmentos de hemossiderina (Coeman *et al*, 2005; Seydel, 1996).

Tabela I – Diagnósticos para identificação de estromas ou glândulas endometriais.

Método	Diagnóstico	Ano
Cistoscopia	Cistoscopia aponta de 65 a 72% dos casos devido as suas características macroscópicas da lesão que variam ao longo do ciclo menstrual.	Brosens, 1994
Colposcopia	O exame feito através da Colposcopia ajuda no diagnóstico nos casos de endometriose cervical ou vaginal.	Giordano, 1998
Laparoscopia	Nessa metodologia é fundamental que seja feita a visualização total da pelve, especialmente da superfície ovariana, da fossa ovárica, do fundo de saco de Douglas e dos ligamentos útero-sacros. Considerado o método padrão.	Abrão, 2007
Ressonância magnética	A ressonância magnética é usada para a avaliação da endometriose, a qual proporciona imagens características em decorrência do ferro nos depósitos de hemossiderina dos endometriomas.	Patterson & Winburn, 1999
Ultra-som	O ultra-som, incluindo o ultra-som bidimensional padrão e o ultra-som endoluminal-retal, tem sido empregado para avaliação da endometriose de cicatriz abdominal e perineal.	Dwivedi <i>et al</i> , 2002
Tomografia computadorizada	A tomografia computadorizada pode ser útil em revelar a extensão da doença, na massa sólida ou mista, bem circunscrita e nas imagens com características de hemorragia subaguda ou hemorragia crônica no seu interior.	Dwivedi <i>et al</i> , 2002

## 1.6 – Sintomas e Endometriose

Os sintomas alteram muito e dependem muitas vezes da localização anatômica da doença. Existem pacientes que têm sintoma como a depressão, ansiedade, alterações de humor, alterações no apetite, e as manifestações comuns que são chamados de síndrome pré-menstrual e do climatério. A intensidade dos sintomas não parece depender do estágio clínico da doença, é comum encontrar mulheres com endometriose mínima com sintomas graves, com a doença avançada e completamente assintomática. E que a endometriose é manifestada numa clínica variada, como dores pélvicas e abdominais, dismenorréia, dispareunia,

irregularidade menstrual e infertilidade. A dimensão da doença pode não estar relacionada com a sintomatologia necessariamente, ou seja, pacientes com endometriose severa podem-se apresentar completamente assintomáticas, enquanto mulheres com graus mínimos da doença podem ter dores e outros sintomas severos (Harrison & Barry, 2000).

Segundo Berek (2005) os principais sintomas da endometriose são dor e infertilidade. De acordo ainda com o autor os sintomas sugestivos de endometriose são cólicas fortes, dores durante as relações sexuais, alterações urinárias (dor ao urinar ou presença de sangue na urina) e alterações intestinais na época da menstruação (dor para evacuar, presença de sangue nas fezes e intestino solto).

## 1.7 – Morfologia

A morfologia macroscópica das lesões é bastante variável. Diversos formatos e várias colorações caracterizam o aspecto da endometriose. Os implantes podem ser polipóides, com invasão do tecido conectivo sub-peritoneal, císticos, ou apresentar lesões fibróticas e inflamatórias. A coloração das lesões pode variar de acordo com a fase evolutiva da doença, em geral observam-se lesões de cor vermelha, amarela, marrom ou preta (Abrão *et al*, 2003).

Os focos de endométrio estão quase sempre relacionados com a influência dos hormônios ovarianos e com frequência que sofrem as alterações menstruais císticas e de sangramento periódico. Esse sangramento provoca uma formação de nódulos nas superfícies serosas ou logo abaixo no local do comprometimento, de aspecto vermelho-azulado a amarelo-acastanhado. Os ovários com endometriose podem tornar-se acentuadamente deformados por grandes espaços císticos (3 a 5 cm de diâmetro) repletos de resquícios de sangue. O diagnóstico histológico da endometriose é direto, no entanto pode ser dificultoso nos casos de longa duração em que o tecido endometrial que é encoberto pela resposta fibro-obliterativa (Rubin & Farber, 2002).

O termo endometrioma (Figura 03) é usado para os implantes endometrióticos que formam uma massa tumoral. Sendo identificados como massas císticas de paredes espessas, lisas e escuras que, quando incisados, liberam líquido denso acastanhado semelhante ao chocolate (Duleba, 1997; Kistner, 1983).

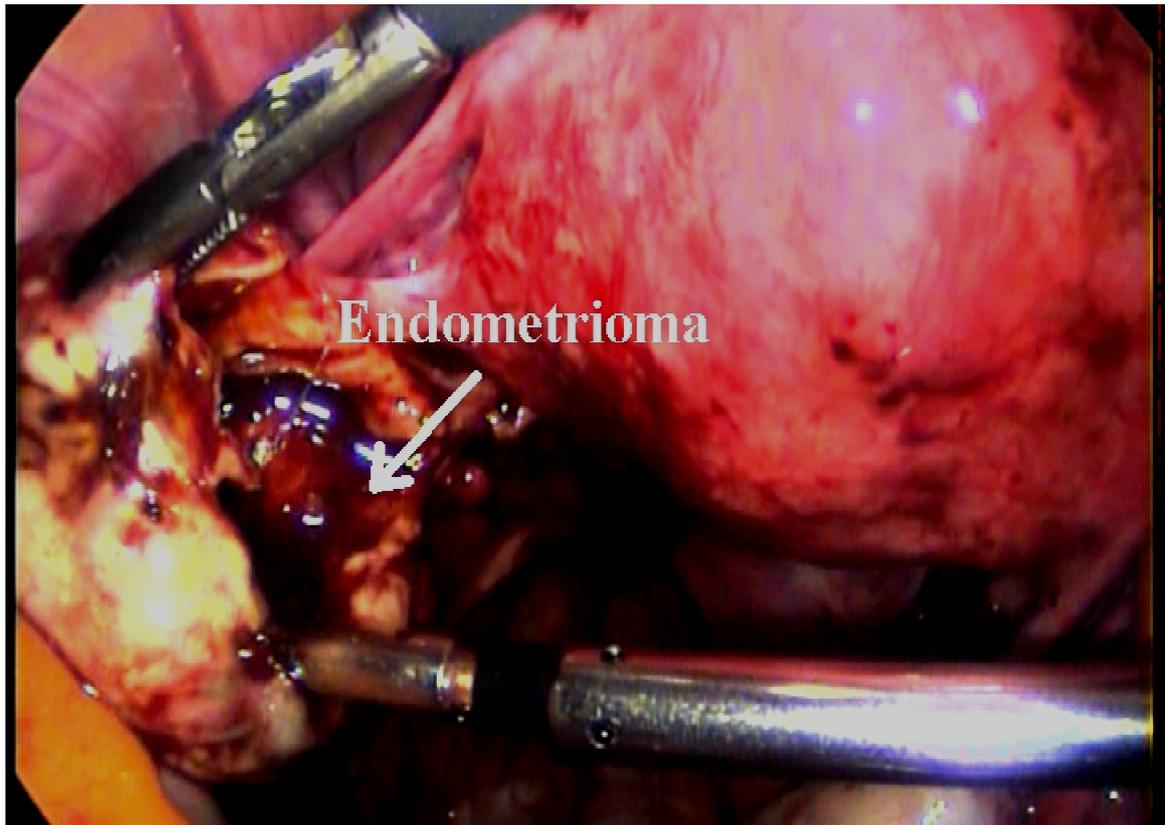


Figura 03: Conteúdo achocolatado do endometrioma (Fonte: Kondo, W. 2010)

As várias teorias talvez sejam pelo fato da dificuldade de uma relação direta entre os sintomas e as presenças da doença dificultam o diagnóstico em paciente assintomática, e a elaboração de um perfil da paciente com endometriose. Em algumas situações os achados histopatológicos da endometriose esta sujeito na duração da doença e da profundidade da penetração das lesões. A endometriose na parede abdominal está na maioria das vezes localizada na pele, no tecido celular subcutâneo ou aderido ao tecido anterior dos retos abdominais. Os implantes podem mudar de aparência durante o ciclo menstrual, tornando-se mais macios e congestionados, sangrando em alguns casos. Os endometriomas são os resultados de reproduzidos sangramentos cíclicos dentro de implantes profundos, dando a aparência de “cistos de chocolate” (Coeman *et al*, 2005; Satataloff *et al*, 1989).

A endometriose pode ser apresentada em três diferentes formas: a primeira delas é a endometriose ovariana, que se caracteriza pela formação de cistos nos ovários (endometriomas). Essa multiplicidade pode estar associada à infertilidade, entretanto, a causa da dor é muito importante. As outras formas de apresentação

são a endometriose superficial, em que ocorre uma invasão de até 0,5 cm de profundidade no peritônio de órgãos como bexiga, intestino, colo uterino; e a profunda, que infiltra 0,5 cm ou mais o peritônio desses órgãos. Nesse último estágio os sintomas são mais exuberantes e os tratamentos cirúrgicos mais complexos (Rubin & Farber, 2002).

## 1.8 – Infertilidade

Na mulher a redução da fertilidade pode estar ligada em aderências desenvolvida entre os ovários e as trompas, ou devido a substâncias produzidas pelos implantes de endometriose, o que impede a ovulação normal, a fertilização e a implantação. Do mesmo modo com a deformidade da anatomia pélvica ou com as alterações no desenvolvimento do ovócito e do embrião, ou uma redução de receptividade do endométrio. Já em mulheres que possuem ferimentos leves e que mesmo fazendo um tratamento médico não conseguem alterar a fertilidade, mantendo assim, a sua fertilidade baixa. Assim, só pode ser melhorada através de um tratamento cirúrgico nas lesões (Barros, 2000).

Segundo Bankowski (2006), a conseqüência da endometriose com respeito á fertilidade pode ser devido a uma alteração ambiental, afetando a ligação entre o espermatozóide e o óvulo. Nos casos da doença já avançada nas aderências pélvicas, nas aderências tubárias ou nas aderências ovarianas, pode haver uma interferência no transporte do gameta ou embrião. De acordo ainda com o autor os achados clínicos comuns após exame físico incluem nodularidade dos ligamentos uterossacos, os quais freqüentemente encontram-se aumentados e dolorosos, ou dor anexal, edema doloroso, septo reto vaginal e dor à mobilização do útero.

A endometriose tem sido associada de alguma forma com a infertilidade, tornando-se comum em mulheres com endometriose. Estudos indicam que a endometriose (Figura 04) atinge aproximadamente 5% da população feminina universal, enquanto que em mulheres inférteis a prevalência poderia chegar a valores maiores que 30%. Mais que isso, diversos trabalhos na maioria demonstraram que a taxa de fecundidade mensal de pacientes com endometriose pode estar reduzida a metade quando comparadas às mulheres que não possuem a doença (Witz & Burns, 2002).

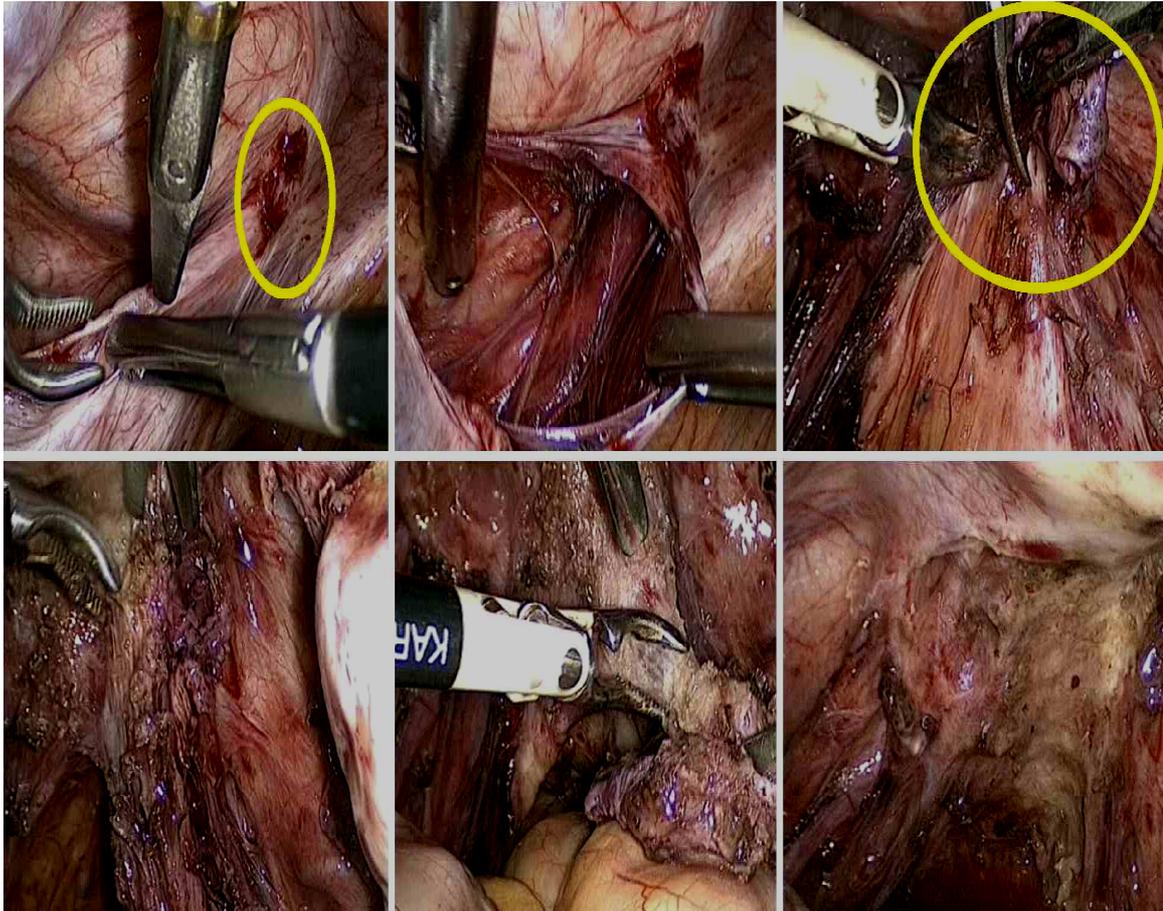


Figura 04: Endometriose em ligamento útero-sacro esquerdo e em região retro cervical

Fonte: Kondo, 2010.

A precisa relação causa-efeito entre a endometriose e a infertilidade ainda não é evidente e muitas teorias vêm tentando obter uma melhor compreensão da coexistência dessa doença e de como abordá-la de modo benéfico para as mulheres. Na maioria das vezes se atribui a distorções da anatomia pélvica e o mecanismo de infertilidade em casos de endometriose severa, entretanto isso ainda não explicaria a infertilidade em estágios mais precoces da doença (Witz & Burns, 2002).

Donnez & Nisolle (1997) sugerem que os endometriomas são originados através de uma metaplasia mesotelial, no entanto os endometriomas também resultariam numa invaginação do córtex ovariano. Em ambas as teorias, tanto a de implantação ou da metaplasia, os folículos ovarianos estão presentes na base dos pseudocisto endometrióticos (Figura 05).

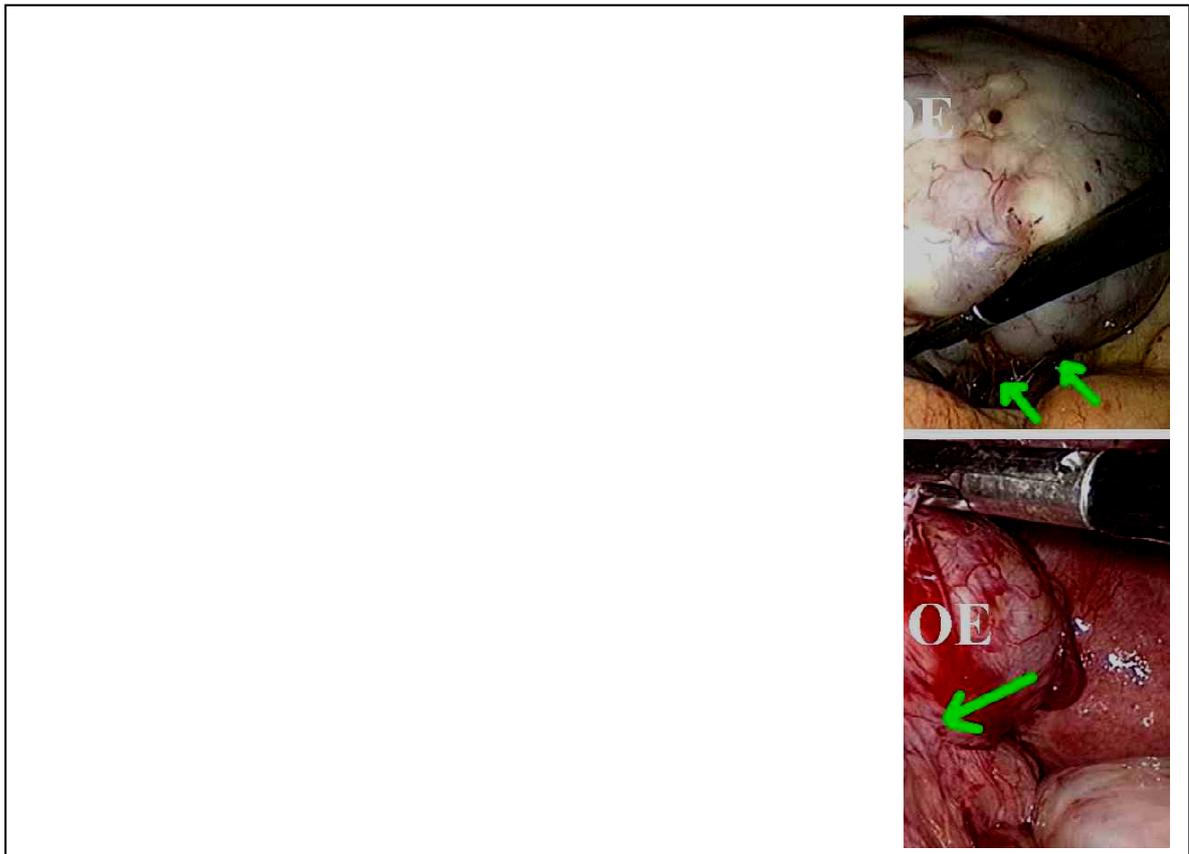


Figura 05: Foto de Endometriomas (endometriose nos ovários). Fonte: Kondo, W. 2010.

## 1.9 - Agentes Xenobióticos

De acordo com OMS (Organização Mundial de Saúde), os biomarcadores podem ser subdivididos em três categorias. Marcadores de exposição, efeitos e suscetibilidade:

1º - Biomarcador de exposição são reconhecidos quando uma presença a substância exógena, de seu metabólito ou de um produto da interação entre um agente xenobiótico e uma molécula-alvo (ou célula), que possa ser medida num compartimento de um organismo.

2º - Biomarcadores de efeito são classificados como qualquer alteração de medida bioquímica, fisiológica, comportamental num organismo que, dependendo de sua amplitude, pode ser reconhecida como dano à saúde ou do mesmo modo na doença.

3º - Biomarcadores de suscetibilidade são definidos como indicadores de resposta relacionados a uma determinada habilidade inata ou adquirida do organismo que pode resultar em alteração na suscetibilidade do indivíduo a uma dada substância.

Podem-se incluir nesta categoria fatores genéticos e alterações na expressão de receptores. Esta subdivisão é algumas vezes ambígua, mas serve para agrupar biomarcadores (Hemmink, 2001).

Os genes e as proteínas relacionados com a metabolização e com a detoxificação de xenobióticos são freqüentemente utilizados em estudos de marcadores potenciais de suscetibilidade para desenvolvimento de várias doenças, inclusive a do câncer, nas quais a etiologia está relacionada à exposição ambiental. Os genes que codificam para enzimas de ativação (reação de fase I) ou detoxificação (reação de fase II) de xenobióticos são alvos potenciais para estudos de suscetibilidade genética (Wilkinson & Clapper, 1997).

### **1.10 - Genes de metabolização**

São muitos os estudos que apontam a detoxificação celular feita através de enzimas que estão relacionadas com a proteção celular. Revelam que a inativação de xenobióticos e das toxinas endógenas possibilitam a preservação da integridade celular, como também da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a origem de algumas doenças (Wilkinson & Clapper, 1997).

Fundamentado em suas propriedades funcionais, as enzimas de detoxificação são classificadas em 2 grupos. As enzimas de fase I são as enzimas que ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo. Já as enzimas de fase II exercem a função de ativação feita pelas enzimas de fase I, inibindo a formação de produtos eletrofílico, além de catalisarem a conversão do eletrofílico em conjugados inativos, tornando-os mais hidrossolúveis e facilitando sua excreção da célula (Wilkinson & Clapper, 1997).

O exemplo mais conhecido entre as enzimas de fase I, ou enzimas de ativação são as enzimas da superfamília do *Citocromo P450* (CYPs) que são enzimas oxidativas. Os CYPs inserem um átomo de oxigênio no xenobiótico para torná-lo altamente eletrofílico. Enquanto que entre as enzimas de fase II temos como mais estudados os genes da superfamília das glutathione-S-transferase (GSTs) (Cascorbi, 2006).

### 1.10.1 - Glutathione S-transferase - genes *GSTM1* e *GSTT1*

Os polimorfismos de enzimas que promovem conjugação na fase II do metabolismo, como N-acetil-transferases (NATs) e Glutathione-S-transferases (GSTs), e seu papel na suscetibilidade a diversas neoplasias tem sido extensivamente pesquisado (Cascorbi, 2006)

Entre as enzimas de fase II, as Glutathione S-transferases (GSTs) exercem um papel fundamental no metabolismo celular, assim como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com moléculas endógenas, como as glutathionas, como por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos presentes, um exemplo está na fumaça do cigarro e na dieta alimentar, impedindo a ligação destes com o DNA (Hayes *et al*, 2005).

A maior concentração das GSTs foi observada no fígado, no entanto, pode ser encontrada também em outros órgãos, como nos pulmões e no intestino delgado. As GSTs humanas foram agrupadas com base em seu ponto isoelétrico e na seqüência de aminoácidos, em alfa (básicas), mu (próximas ao pH neutro) e teta (ácidas), cada uma contendo produtos de diferentes locos gênicos (Hayes *et al*, 2005).

As enzimas Glutathione-S-transferases estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos incluindo carcinógenos ambientais, nas espécies reativas de oxigênio e nos agentes terapêuticos. As GSTs são de uma superfamília de endógenos e de exógenos que formam através da conjugação da Glutathione endógena com compostos eletrofílicos (Hayes *et al*, 2005).

O gene *GSTM1* está localizado no locus 1p13.1, e o *GSTT1*, localizado no locus 22q11.2, estes descrevem os polimorfismos de presença/ausência, com que resulta na falta das proteínas ativas. Estes polimorfismos apresentam variação de freqüências conforme a população e grupo étnico estudado (Pemble *et al*, 1994). Estudos mostram que a enzima *GSTM1* ativa é responsável pela detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e solventes como o benzeno, enquanto que a *GSTT1* detoxifica pequenos hidrocarbonetos reativos, como o óxido de etileno (Strange & Fryer, 1999).

As enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de sua atividade pode

levar a um aumento na toxicidade e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos. Diversos estudos detectaram uma frequência elevada do genótipo nulo para estes dois genes em indivíduos portadores de diferentes neoplasias (Cascorbi, 2006).

### **1.10.2 - Gene P53**

O gene *p53* possui uma importante função reguladora do ciclo celular e mapeado no braço curto do cromossomo 17, a razão da designação *p53* se deve à codificação da proteína nuclear. As mutações no gene *p53* são eventos genéticos freqüentemente observados em vários tipos de câncer em humanos e relacionados com o agente ambiental envolvido (Greenblatt *et al.*, 1994).

O processo da gênese tumoral está fortemente associado à reprodução celular, e com os mecanismos que regem o ciclo celular. Para que a cada ciclo duas células-filhas idênticas sejam geradas, é necessário que ocorra duplicação e subsequente segregação dos cromossomos e demais componentes da célula. Os cromossomos são replicados numa fase conhecida como S (síntese) e segregados para as células-filhas na fase M (mitose) do ciclo celular. Esse processo ocorre de forma contínua, passando de G1-S-G2-M. O controle do ciclo celular é feito basicamente por intermédio de proteínas que atuam nas fases G1 e G2, acionando mecanismos de reparo ou interrompendo o processo de divisão celular quando detecta mutações no material genético (Harris, 1981).

Grande parte dos genes supressores tumorais sintetiza proteínas com função na regulação do ciclo celular, as quais, quando ausentes ou ineficientes, podem contribuir para a evolução de clones de células tumorais. O gene *p53* é uma das proteínas que controla o ciclo celular, durante a fase G1, retardando o processo de divisão para que ocorra o reparo ou mesmo impedindo a divisão celular através de apoptose (morte celular). Por outro lado, mutações no gene *p53* induzem à formação de proteínas alteradas que não conseguem interromper o processo de divisão celular e, sem tempo suficiente para que ocorra o reparo do DNA, a célula carrega o dano para as divisões subsequentes possibilitando a formação dos tumores (Harris, 1981).

As classes de lesões do DNA incluem basicamente nas perdas ou nas

deleções, na substituição da pares de bases, nas inserções, nas ampliações, nas duplicações, inversões e translocações. Não ficou claro se tais alterações são causa ou consequência de câncer. Mesmo porque a história natural da doença parece envolver não uma, mas várias mutações genéticas. Onde a prevalência de mutações do gene *p53* nos tecidos neoplásicos varia de acordo com o sítio anatômico do tumor, de 0%, em tumores de testículos e da hipófise, a mais de 50%, nos tumores de pulmão e cólon (Greenblatt *et al.*, 1994).

A associação entre endometriose e câncer está baseada na informação adquirida através de estudos cromossômicos. Indicando que as regiões que abrigam os oncogenes provavelmente ganham materiais, do mesmo modo que os genes supressores tumorais localizados em regiões tenham perdas cromossômicas. Estas alterações foram descritas em regiões onde há perdas de seqüências de DNA, como nas regiões 1p, 5p, 6q e 22q. Entre os genes com possível desencadeamento de malignidade, estão os supressores tumorais *PTEN* e *TP53* e os proto-oncogenes *Bcl-2* e *c-myc*. Entretanto os estudos experimentais freqüentemente não se correlacionam com os dados clínicos. Habitualmente as alterações na função ovulatória, tanto na fase folicular quanto na deficiência da fase lútea, na LUF (síndrome de luteinização do folículo não roto), na anovulação, na hiperprolactinemia, tem sido freqüentemente encontrado em algumas pacientes com endometriose (Vigano *et al.*, 2006).

### **1.10.3 - Citocromo P450 (CYP)**

O termo *Citocromo P450* é específico utilizado para denominar uma família de enzimas que tem a terminologia 450 em sua nomenclatura. As enzimas P450 podem metabolizar uma série de substratos. A superfamília de genes do *citocromo P450* codifica numerosas enzimas que catalisam uma variedade de reações químicas e metaboliza um grande número de substratos exógenos e endógenos, como lipídeos e esteróides (Cascorbi, 2006).

As enzimas citocromo P450 (*CYP*) constituem uma superfamília de proteínas que podem ser encontradas desde as bactérias até ao homem, e estão envolvidas no metabolismo de uma grande variedade de compostos. Desde a sua origem há mais de 3,5 mil milhões de anos, a família dos genes *CYP* diversificou-se para

acomodar o metabolismo de um número crescente de toxinas ambientais, compostos da dieta e drogas (Nelson, 1996).

O sistema biológico de metabolização é encontrado em procariotos e eucariotos. Todos os genes desta superfamília evoluíram a partir de um ancestral comum, há cerca de dois bilhões e meio de anos, calcula-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas P450, sendo que muitos deles estejam envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos. Estão incluídos os substratos para *CYP450*, as vitaminas, os esteróides, os ácidos graxos, as prostaglandinas, as aminas e os xenobióticos de um modo geral, tais como as drogas, os carcinógenos ambientais, os antioxidantes, os solventes, os anestésicos, os corantes, as pesticidas, produtos derivados do petróleo, os alcoóis (Conforti, 2004).

O sistema de classificação é baseado na porcentagem de homologia entre a seqüência dos *CYPs* facilita a construção de uma árvore filogenética para esta superfamília de enzimas. O gene ancestral *CYP* deverá ter aparecido há cerca de 3500 milhões de anos nas espécies procariotas, na altura em que a atmosfera sofreu alterações e terá começado a haver oxigênio disponível para as transformações catalíticas mediadas pelos *CYPs*. O gene ancestral (Tabela 2) deve ter sofrido duplicação há cerca de 1360 milhões de anos, o que deu origem a evolução dos *CYPs* (Lewis & Sheridan, 2001).

Tabela II – A evolução dos *CYPs* tempo milhões de anos.

Tempo	Divergências na superfamília <i>CYP</i>
2000	<i>CYPs</i> eucariotas e procariotas
1000	Distância evolutiva microssomais e mitocondriais
800	As famílias <i>CYP3</i> e <i>CYP4</i> separaram-se dos outros <i>CYPs</i> microssomais
650	Divergência entre <i>CYP3</i> e <i>CYP4</i>
550	As famílias <i>CYP1</i> e <i>CYP2</i> divergiram da <i>CYP17</i> e <i>CYP21</i>
470	Divergência entre <i>CYP1</i> e <i>CYP2</i>
450	Divergência entre <i>CYP17</i> e <i>CYP21</i>
370	Divergência da subfamília <i>CYP2D</i> da família <i>CYP2</i>
300	A subfamília <i>CYP2D</i> expande-se
250	Divergência da família <i>CYP2</i>
230	Divergência das subfamílias <i>CYP2A</i> e <i>CYP2B</i> , <i>CYP2C</i> e <i>YP2E</i>
120	Divergência entre <i>CYP1A1</i> e <i>CYP1A2</i>
80	Especialização das famílias e subfamílias <i>CYP</i>

Fonte: Lewis e Sheridan, 2001.

A expressão citocromo P450 é designado para um agrupamento de proteínas que contêm um grupo heme e que difere ligeiramente umas das outras pelos seus pesos moleculares, devido à apresentação de ligação com o monóxido de carbono (CO), às propriedades eletroforéticas e imunológicas e pelas atividades catalíticas para as diferentes drogas. O genoma humano contém em torno de 50 diferentes genes P450, subdivididos em 10 subfamílias (Kalant *et al*, 1991).

De todas as famílias da fase I a do citocromo P450 é a mais importante devido ao nível do elevado número de xenobióticos que detoxifica, na versatilidade catalítica que apresentam. O papel destas enzimas é relevante para o metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutor de numerosos e diversos compostos endógenos e exógenos (Nelson, 1996).

Os metabolitos ativados nesta fase podem, em certos casos, ser mais tóxicos que o substrato original, podendo ser depois conjugados com uma molécula endógena, como o ácido glucurónico, a glutatona ou o sulfato, nas chamadas reações de fase II ou de conjugação (Adashi *et al*, 1996).

Em 1987 um novo sistema de nomenclatura foi proposto pela primeira vez, no entanto diversas atualizações foram publicadas à medida que surgiram novas formas desta enzima. Na nova nomenclatura um número após a letra denota cada isoenzima individual, e assim um gene individual designa-se, por exemplo, como *CYP1A1*. Para ser considerado um novo membro individual, uma seqüência deve diferir de uma para outra mais que 3%. No caso dos genes a notação *CYP* apresenta-se em itálico (*CYP*), enquanto para as proteínas, mRNA e cDNAs a sigla não é apresentada em itálico e todas as letras são maiúsculas, qualquer que seja a espécie (Nelson, 1996).

De acordo com Nelson (1996) os metabólitos resultantes deste processo são geralmente menos ativos que o composto inicial ou mesmo inativos, embora possa também acontecer o caso dos produtos finais apresentarem uma atividade farmacológica realçada. Porém, o metabolismo de xenobióticos pode produzir produtos reativos e tóxicos que podem ser responsáveis por várias formas de toxicidade, incluindo a iniciação e progressão de tumores.

O sistema *citocromo P450(CYP)*, tem como constituição: coleção de isoenzimas, agrupadas por família, subfamília e gene responsável pela sua transcrição. Famílias: primeiro numeral arábico *CYP1A1*, subfamílias: letras

alfabéticas, gene: último numeral arábico. Se a semelhança em aminoácidos e sua seqüência são de pelo menos 40%, a enzima pertence à mesma família. Se a seqüência é 55 - 99% homóloga, a enzima pertence à mesma subfamília (Adashi *et al*, 1996).

Sua nomenclatura atualmente é baseada a partir da homologia estrutural.

Exemplo: *CYP1A1*

*CYP* – Símbolo do *Citocromo P450*;

*CYP1* – Família do gene; > 40% identidade;

*CYP1A* – Subfamília do gene; > 55% identidade;

*CYP1A1* – Membro individual da subfamília.

Nestas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos e dos ácidos graxos. Existem altos índices de expressão de *CYPs* nos tecidos hepáticos, mas todos os tecidos expressam essas enzimas em nível tecido-específico. A aromatase compreende duas proteínas: *P450arom* e *NADPH citocromo P450* redutase. O Citocromo P450 catalisa uma série de reações que formam o anel fenólico A que caracteriza os estrogênios; a *NADPH citocromo P450* redutase é uma flavoproteína presente na maioria das células responsável pela redução da *NADPH* para a forma microssoma do *citocromo P450* (Adashi *et al*, 1996).

Só recentemente foi resolvida uma estrutura de um cristal de *CYP* de mamíferos, o *CYP2C5* de coelho. A denominação destas isoenzimas P450 está dividida em três famílias, sendo elas a *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* com base em sua relação evolutiva, similaridade de seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos. As freqüências das variantes alélicas da superfamília *CYP* diferem entre as etnias (Shastry, 2006).

Na atividade catalítica e o modo de indução da enzima *CYP1A1* parecem ser altamente conservados, confirmando sua importante função fisiológica. O padrão da atividade e da capacidade indutora, relacionados com a formação dos metabólitos de PAHs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), é de grande importância na estimativa do risco de desenvolver câncer. Esta enzima é expressada principalmente no pulmão, linfócitos e na placenta (Anttilla *et al.*, 1991).

O *CYP1A1* é um gene chave do metabolismo de carcinógenos, tornando-se um biomarcador de suscetibilidade ao câncer, principalmente em tumores ligados ao hábito tabagista. Localizado no cromossomo 15 (15q22-24, (Figura 06) s vários



*citocromo P450* e codifica para a enzima Aril Hidrocarbono Hidroxilase (AHH). Esta enzima catalisa o primeiro passo no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tal como aqueles encontrados na fumaça do cigarro, transformando-os em carcinógenos (Hatagima, 2002; Autrup, 2000).

Cascorbi (2006) aponta este gene altamente polimórfico, uma mutação pontual timina/citosina no sítio de restrição da *MspI* do *CYP1A1* tem mostrado uma associação de uma forma mais induzível de *CYP1A1*. Os níveis elevados das enzimas correspondentes resultariam numa capacidade aumentada de ativar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, produzindo intermediários eletrofílico altamente reativos que poderiam levar ao dano no DNA (Walker, 1996).

Previamente mostrou-se a presença de transceptores da P450 em implantes endometrióticos pélvicos e fragmentos endometriais ectópicos de pacientes com endometriose enquanto que no endométrio de mulheres sem a doença ou em suas biópsias peritoneais não foi encontrado aromatase (Kitawaki *et al*, 1999).

De acordo com Ackerman e colaboradores (1981), nas mulheres em idade reprodutiva a biossíntese dos estrógenos acontece no ovário, enquanto que depois da menopausa a produção estrogênica ocorre especialmente da conversão periférica de andrógenos, pela ação do *CYP* em tecidos extra glandulares como a pele e o tecido adiposo, este último ao contrário do ovário, não é mediado por AMPc (Adenosina monofosfato cíclico, molécula importante na transdução de sinal em uma célula). Não é um tipo de mensageiro secundário celular e sim por citosinas como as interleucinas 6 a 11 e um fator de necrose tumoral e dos glicocorticóides ocorre neste caso do gene *CYP 19*.

O principal mecanismo de formação estrogênica nas mulheres após a menopausa parece ser a aromatização extragonadal e extra-hepática da androstenediona. A fração de conversão no plasma de androstenediona em estroma (E1) aumenta com a obesidade, de acordo com a idade e as doenças hepáticas. Esta fração de conversão mostra uma relação positiva com peso corporal excessivo em ambas às mulheres, na pré e após a menopausa, e pode aumentar em cerca de 10 vezes a morbidade de mulheres obesas climatéricas (Ackerman *et al*, 1981).

Análises em mulheres com endometriose moderada ou grave comprovaram a expressão e o aumento da atividade do *CYP* em implantes peritoneais, nos implantes ovarianos e no endométrio tópico. Observou-se um aumento na

concentração local do estrogênio nestes tecidos, enquanto que nas mulheres sem endometriose, adenomiose e miomatose, notou que o endométrio não tem níveis detectáveis, justificando uma provável produção da aromatase no local para manter a permanência do foco de endometriose (Kitawaki *et al*, 1999).

Da mesma forma polimorfismos gênicos de *CYP 19* e de *CYP 17* (genes para (codificação da aromatase) foram encontrados em altos níveis em implantes de mulheres com endometriose e endometriomas, sugerindo que este efeito dos metabólitos de estrogênio e sua produção *in loco* possam explicar a permanência de endometriose em mulheres climatéricas (Takayama *et al*, 1998).

A chave para o desenvolvimento de endometriose pode ser a resposta inflamatória endometrial acentuada, capaz inclusive de estimular sua progressão. A prostaglandina E2 (PGE2) encontrada no estroma de endometriose, é considerada como principal indutor da transcrição da aromatase e de sua atividade estimuladora exercida através do promotor II do gene *CYP 19*. Além de que o próprio estrógeno aumenta a produção de PGE2 através de um estímulo exercido sobre a ciclooxigenase do tipo 2 (COX2) (Noble *et al*, 1997).

Foram observadas também taxas de recorrência de dor pélvica de até 75% em 05 anos, em pacientes submetidas a tratamento clínico exclusivo com análogos do GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina). Tal fato pode ser explicado pela produção extra-glandular de estradiol e pela retomada da esteroidogênese ovariana após o término do tratamento. Acredita-se que esta retroalimentação positiva possibilita a criação de um ciclo vicioso, de uma sucessiva produção local de PGE2 e estrógeno, favorecendo as características inflamatórias e intensa atividade celular da endometriose (Takayama *et al*, 1998).

Em 1998, o uso bem sucedido de uma droga inibidora de aromatase, no tratamento de mulher de 57 anos, com endometriose grave recorrente em cúpula vaginal, foi o primeiro relato de sucesso deste tratamento para eliminação da dor e dos focos remanescentes de endometriose respondidos por outros tratamentos, sugerindo que o bloqueio local da atividade da aromatase possa bloquear a produção local de estradiol (Takayama *et al*, 1998).

Ultimamente observa-se nos trabalhos de pesquisa científica uma tendência em se utilizar um conjunto de marcadores para detectar alterações induzidas por xenobióticos sobre os organismos.

## 2 - JUSTIFICATIVA

A exposição da mulher a substâncias tóxicas como: dióxidos de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, exposição a pesticidas e outros elementos que favorecem o aparecimento da endometriose, pois, essas substâncias se alojam nos tecidos e na corrente sanguínea, alterando o sistema imune dos indivíduos (Rier & Foster, 2002; Petta, 2002).

O aumento de casos expressivos no número de pacientes inférteis, portadoras de endometriose nos últimos dez anos. Essa comprovação pode significar o acréscimo desta doença na população feminina ou, simplesmente, a melhora da investigação diagnóstica do casal infértil, especialmente com o desenvolvimento da vídeolaparoscopia como instrumento diagnóstico principal desta patologia (Abrão, 2007).

Dados oficiais ressaltam a existência de 5 milhões de mulheres portadoras de endometriose no Brasil (ABEND, 2009). A infertilidade afeta entre 30% a 50% das mulheres com endometriose é infértil (Abrão, 2007).

Considerando que o sistema gênico polimórfico *CYP1A1* seja responsável pelas reações de metabolismo xenobiótico, capaz de influenciar significativamente na susceptibilidade aos carcinógenos e conseqüentemente ao desenvolvimento de câncer, torna-se necessário a realização de estudos deste biomarcador de susceptibilidade em amostras de portadoras de endometriose, com alterações genéticas. O polimorfismo, *CYP1A1* foi correlacionado com a endometriose e com o grau de severidade da doença (Yao *et al*, 2006; Nakata *et al*, 2004; Carvalho *et al*, 2004).

O estudo visa analisar dois grupos de pacientes portadoras de endometriose com e sem infertilidade e se existe alterações significativas nestes dois grupos, os resultados poderão contribuir para um novo diagnóstico correlacionado infertilidade com a endometriose.

### 3 - OBJETIVOS

- Analisar o polimorfismo *MspI* do gene *CYP1A1m1* no grupo caso/controle com diagnóstico de endometriose, no qual em um deles foi detectada a infertilidade e no outro não.

#### 3.1 - Objetivos Específicos

- Analisar a frequência e as manifestações relacionadas com o polimorfismo do gene *CYP1A1m1*;

- Analisar a frequência e as manifestações relacionadas ao marcador *CYP 1A1m1*;

- Comparar as frequências com aquelas observadas em um grupo que não apresenta a doença (controle);

- Analisar a frequência e as manifestações relacionadas com o polimorfismo do gene *CYP1A1m1* comparando com as frequências do polimorfismo do gene *p53* ;

- Verificar a possibilidade do gene *CYP1A1m1* como marcador molecular para diagnóstico de infertilidade correlacionado com endometriose.

## 4 – MATERIAL E MÉTODO

Para realização deste estudo, foram coletadas 94 amostras de 10 ml de sangue periférico das quais foram feitas análises genética moleculares. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Goiás (CEP). Todas as pacientes participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I); Consentimento da participação da pessoa como sujeito (ANEXO II) e responderam um questionário (ANEXO III).

As 94 amostras foram divididas em dois grupos: grupo I com 52 amostras de pacientes com endometriose, comprovadas por laparoscopia (ANEXO IV). O grupo I foi subdividido em 02 subgrupos (A e B), no grupo A pacientes (24) com queixa de infertilidade e com a intenção de engravidar. No segundo grupo B as pacientes (28) com endometriose e sem a intenção de engravidar. E o grupo II, o grupo controle que consistiu de 42 mulheres sem sinais clínicos de endometriose.

Após a laparoscopia as pacientes com endometriose foram classificadas de acordo com o grau da endometriose (ANEXO V):

- \*Estádio I (mínimo) /Estádio II (leve)
- \*Estádio III (moderado) Estádio IV (severo)

### 4.1- Extrações de DNA genômico

A extração de DNA sangüíneo foi realizada utilizando-se o conjunto de reagentes “*Wizard Genomic DNA Purification*” (Promega®), seguindo-se as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi visualizado através do gel de agarose a 2% (ANEXO VI).

### 4.2- Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica que possibilita a síntese enzimática “*in vitro*” de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples), usados como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação.

Estes iniciadores são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos são complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão (Mullis, 1990).

A desnaturação consiste na separação das fitas duplas de DNA, através de elevação da temperatura para 92°C a 95°C. Na etapa de pareamento, a temperatura é rapidamente reduzida para cerca de 55° C, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, o que irá permitir a hibridação DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72° C para que a enzima DNA polimerase atue na extensão, adicionando nucleotídeos, utilizando como molde a seqüência - alvo, de maneira que se realize uma cópia dessa seqüência (Mullis, 1990).

Foram realizadas PCRs específicas para detectar variantes alélicas do polimorfismo do gene *CYP 1A1m1* com um volume final de 25µL (Tabela III). O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, e campo elétrico de 10 V/cm. Em seguida foi corado com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizado no sistema de Vídeo Documentação VDS® (Amesham Biosciences USA).

Tabela III- Reagentes utilizados no processo da PCR do gene *CYP1A1* e suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração	Volume p/ 1 amostra
Tampão (5x)	1X	5,0µL
dNTPs (100mM)	0,2mM	2,0 µL
Taq DNA polimerase (54/mL)	1,25 µL/25mL	0,2 µL
MgCl <sub>2</sub> (7.5mM)	1,5mM	1,5 µL
Água MiliQ	----	12,3 µL
Primer sense (1mM)	0,02mM	0,5 µL
Primer antisense (1mM)	0,02mM	0,5 µL
DNA	---	3,0 µL
Volume total		25 µL

Todos os reagentes foram adicionados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na

reação. Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 3,0 µL do DNA genômico previamente aquecido e 22 µL da mistura de reação, somando um volume total de 25µL. Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) e submetidos ao programa: 1 ciclo: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minutos; 1 ciclo: 72°C por 2 minutos; Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi guardado em freezer (4°C) até sua utilização. Os testes foram realizados em duplicata, com controle interno de DNA do gene ZFX/Y.

### 4.3 - Digestão Enzimática

Os iniciadores *CYP1A1* Sense e Antisense originam um produto de amplificação de 340 pb referente ao genótipo homozigoto selvagem (W1/W1), o qual não sofre ação da enzima de restrição *MspI*, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto mutante (m1/m1) possui um sítio para a enzima de restrição *MspI*, que cliva o produto de amplificação, gerando duas bandas de 200 pb e 140 pb e o genótipo heterozigoto (W1/m1) corresponde às 3 bandas de 340, 200 e 140 pb (Tabela IV), Carstensen *et al.*, (1993).

Tabela IV – Iniciadores e condições de amplificação para o gene *CYP1A1* e o ZFX/y.

Gene <i>CYP 1A1</i>	Iniciadores (5' – 3')	Tamanho do fragmento
Sense	' 5'CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT3'	340 pb
Antisense	5'TAG GAG TCT TGT CTC ATG GCCT3	140pb e 200pb
<i>ZFX/Y</i>		
Sense	ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACAC	495 pb
Antisense	GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAGT	

Pares de bases: W1/W1= T/T, 340 pb; W1/m1= T/C, 200 pb e m1/m1= C/C, 140 pb (Fonte: CARSTENSEN *et al.*, 1993).

Reagentes utilizados no processo da digestão enzimática *MspI* (*CYP 1A1m1*) e suas respectivas concentrações. (Tabela V). Os reagentes foram misturados em um único microtubo de 1,5 mL. Para cada microtubo de 0,5 mL foi pipetado 15 µl do produto da PCR e 15 µ L da mistura de reação, somando um volume total de 30 µL. A reação permaneceu a 37°C durante 12 horas. Os fragmentos clivados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo para a visualização da corrida.

Tabela V - Reagentes utilizados no processo da digestão enzimática *MspI* (*CYP 1A1m1*) e suas respectivas concentrações.

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

Os iniciadores *CYP1A1* Sense e Antisense originam um produto de amplificação no processo da digestão enzimática *MspI* (*CYP 1A1m1*).

Tabela VI – Iniciadores e condições de amplificação para o gene *CYP1A1m1*.

Enzima de Restrição	Iniciadores (5' – 3')	Condições de reação
<i>MspI</i> (3801T→C)	5'CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT3' 5'TAG GAG TCT TGT CTC ATG GCCT3'	37°C por 12 horas.

pb: pares de bases: W1/W1= T/T; W1/m1= T/C e m1/m1= C/C (Fonte: Carstensen *et al.*, 1993).

Foram realizadas PCRs específicas para detectar variantes alélicas do polimorfismo no códon 72 do gene *p53*; com um volume final de 25µL. O produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, e campo elétrico de 10 V/cm. Em seguida foi corado com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizado no sistema de Vídeo Documentação VDS® (Amesham Biosciencs USA).

Os iniciadores da *p53-PRO* (Tabela VII) Sense e Antisense originam um produto de amplificação de 177pb, referente ao genótipo (Pro) quando homocigoto (Pro/Pro), com controle interno de DNA do gene *ZFX/Y*. Tamanho esperado do fragmento para a amplificação da região que contém o polimorfismo no códon 72 do gene *p53*, (Ribeiro Júnior, 2009).

Tabela VII – Iniciadores e condições de amplificação do *primers p53-PRO* e tamanho esperado do fragmento.

Primer <i>p53-PRO</i>	Iniciadores (5' – 3')	Tamanho do fragmento
Sense	5'GCC AGA GGC TGC TCC CCC3'	177 pb
Antisense	5'ATC TCA AGT CCC CCT TGC CG	
<i>ZFX/Y</i>		
Sense	5'ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACAC3'	495pb
Antisense	5'GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAGT3'	

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do *p53*-PRO e suas respectivas concentrações. (Tabela VIII).

Tabela VIII - Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do *p53*-PRO e suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração	Volume p/ 1 amostra
Tampão (10x)	1X	2,5µL
dNTPs	1,25mM de cada	0,5 µL de cada = 2,0 µL
Taq DNA polimerase (5U/mL)	2,5 U/µL	0,2 µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0mM	2,0 µL
Água MiliQ	----	15,3 µL
Primer sense	0,02mM	0,5 µL
Primer antisense	0,02mM	0,5 µL
DNA	200ng/ µL	2,0 µL
Volume total		25 µL

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

Todos os reagentes (Tabela VIII) foram adicionados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 2,0 µL do DNA genômico previamente aquecido e 23 µL da mistura de reação, somando um volume total de 25µL. Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) e submetidos ao programa: 1 ciclo: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo: 72°C por 7 minutos; Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi guardado em freezer (4°C) até sua utilização, os testes foram realizados em duplicata (Ribeiro Júnior, 2009).

Os iniciadores da *p53*-ARG (Tabela IX) Sense e Antisense originam um produto de amplificação referente ao genótipo (Arg) de 141pb, quando homozigoto (Arg/Arg). Tamanho esperado do fragmento para a amplificação da região que contém o polimorfismo no códon 72 do gene *p53*, (Ribeiro Júnior, 2009).

Tabela IX – Iniciadores e condições de amplificação do *primers p53*-ARG e tamanho esperado do fragmento.

Primer <i>p53</i> -ARG	Iniciadores (5' – 3')	Tamanho do fragmento
Sense	CTG GTG CAG GGG CCA CGC	141 pb
Antisense	CTG GC AGT CAC AGA CTT	

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do *p53*-ARG e suas respectivas concentrações. (Tabela X).

Tabela X - Reagentes utilizados no processo da PCR do polimorfismo no códon 72 do *p53*-ARG e suas respectivas concentrações.

Reagentes	Concentração	Volume p/ 1 amostra
Tampão (10X)	1X	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2,0 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer sense	0,02 mM	0,5 µL
Primer antisense	0,02 mM	0,5 µL
H <sub>2</sub> O Mili Q	---	15,8 µL
DNA amostra	200 ng/ µL	2,0 µL
Volume final		25,0 µL

Fonte: Ribeiro Júnior, 2009

Todos os reagentes (Tabela X) foram adicionados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras que foram utilizadas na reação. Em cada microtubo de 0,5 ml foi pipetado 2,0 µL do DNA genômico previamente aquecido e 23 µL da mistura de reação, somando um volume total de 25µL. Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf) e submetidos ao programa: 1 ciclo: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto, 70°C por 1 minuto; 1 ciclo: 70°C por 1 minuto. Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi guardado em freezer (4°C) até sua utilização (Ribeiro Júnior, 2009).

#### 4.4 – Análise Estatística

As comparações entre os dados das pacientes estudadas foram analisados empregando os cálculos estatísticos da média e do desvio padrão e o teste Mann Whitney para identificação da diferença entre as médias dos grupos. Para análise estatística das freqüências estudadas utilizou o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), o teste do qui-quadrado foi aplicado com o objetivo de verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente em pacientes e controles. O uso de pílula anticoncepcional,

a classificação da endometriose Grau I/Grau II ou Grau III/Grau IV, atividade física, o uso do tabaco, bebida alcoólica e com o gene P53. Os resultados obtidos foram analisados utilizando os programas da Bio Start ® 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq). As diferenças foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 5 % ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 - RESULTADOS

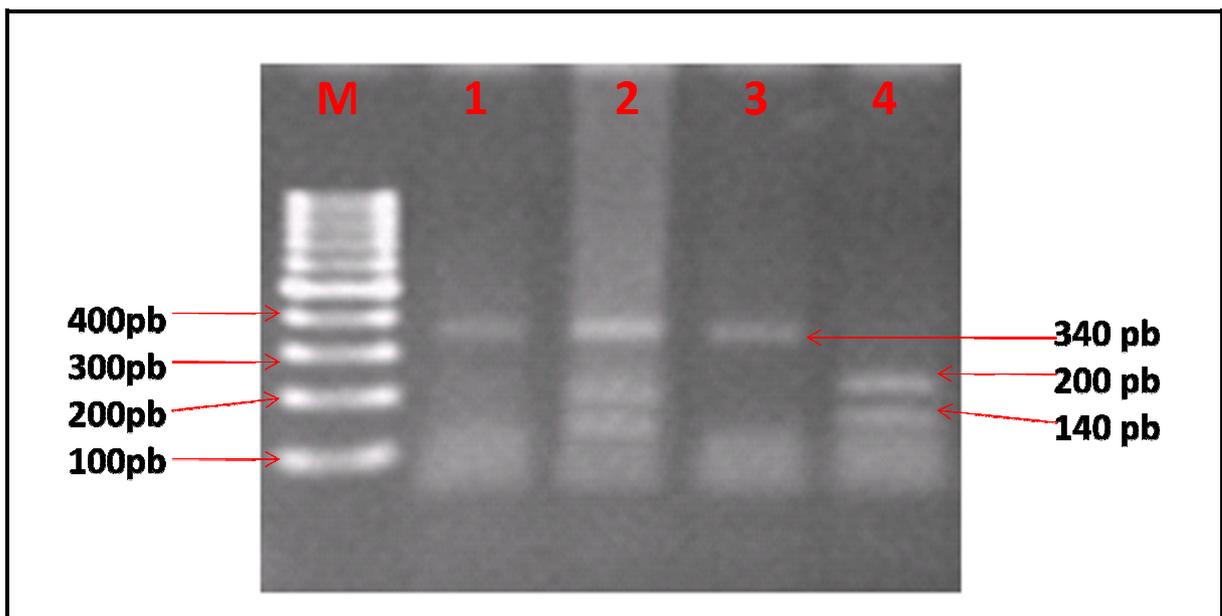
Das 94 amostras de sangue periférico estudadas, 52 amostras pertencem ao grupo de pacientes com endometriose e 42 amostras do grupo controle, pacientes sem clínica de endometriose. A faixa etária das pacientes do grupo com endometriose está entre 25 e 35 anos, sendo a média de 30,23 anos com o desvio padrão de 2,92. O grupo controle (sem endometriose) está entre 19 e 57 anos, com a média de 37,38 anos com o desvio padrão de 11,36. A média do grupo controle é quase quatro vezes (3,89) maior do grupo das pacientes com endometriose, sendo essa diferença significativa,  $p = 0,0004$  (Tabela XI).

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

Grupos	n	$\bar{x}$	DP	p
Endometriose	52	30,23	2,92	0,0004
Controle	42	37,38	11,36	

O valor do teste U Mann Whitney,  $p \leq 0,05$ .

As 94 amostras de DNA extraídos foram submetidas à análise do polimorfismo do gene *CYP1A1*m1 pela técnica de PCR e digestão enzimática.



**Figura 07:** Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas relativas ao primer CYP 1A1 para a detecção do polimorfismo *CYP1A1* T → C detectado pela enzima *MspI*, onde M = marcador de peso molecular (100pb invitrogen). Linha 1: homozigoto para o alelo selvagem (W1/W1). Linha 2: heterozigoto (W1/m1). Linha 3: homozigoto para o alelo selvagem. Linha 4: homozigoto para o alelo mutante (m1/m1).

As freqüências genóticas do gene *CYP1A1m1* nas pacientes (tabela XII) com endometriose (n = 52) para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 67,31% (35/52), 28,84 % (15/52) do genótipo heterocigoto (W1/m1) e 3,85% (2/52) do genótipo mutante (m1/m1). As freqüências genóticas do gene *CYP1A1* nas pacientes do grupo controle (n=42) para o genótipo W1/W1 foi de 85,71% (36/42), do genótipo heterocigoto (W1/m1) foi de 14,29% (06/42) e 0,0% (0/42) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências dos genótipos polimórficos W1/m1 e m1/m1 foi maior nas pacientes com endometriose comparado com grupo controle (Figura 07), sendo essa diferença insignificante,  $p = 0,087$ .

Tabela XII - Distribuição das freqüências genóticas para o gene *CYP1A1m1* caso (endometriose) X grupo controle

Genótipo	Endometriose (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(35) 67,31	(36) 85,71			
W1/m1	(15) 28,84	(06) 14,29	4,862	2	0,087
m1/m1	(02) 3,85	00			
Total	(52) 100	(42) 100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências alélicas W1 do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes (tabela XIII) com endometriose (n = 104) para o alelo homocigoto selvagem foi de 67,30% (70/104) e de 32,70 % (34/104) para o alelo mutante (m1) As freqüências nas pacientes do grupo controle (n=84) para o alelo homocigoto selvagem (W1) 85,71% (72/84) e para o alelo m1 (mutante) foi de 14,29% (12/84). As freqüências dos alelos mutantes (m1) foi maior nas pacientes com endometriose comparado com grupo controle, sendo essa diferença significativa,  $p = 0,006$ .

Tabela XIII - Distribuição das freqüências alélicas para o gene *CYP1A1m1* caso (endometriose) X grupo controle

Alelos	Endometriose (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1	(70) 67,30	(72) 85,71			
m1	(34) 32,70	(12) 14,29	8,519	1	0,006
Total	(104) 100	(84) 100			

Valor do  $P \leq 0,05$

As freqüências dos genótipos *CYP1A1m1* (tabela XIV) comparando com a

classificação da endometriose dos Grau I/II e Grau III/IV verificou-se que para as pacientes com o genótipo W1/W1 foi de 68,19% (15/22), para o genótipo W1/m1 foi de 31,81% (07/22) e para o genótipo m1/m1 foi de 0,0% (0,0/22). Para o Grau III /Grau IV as pacientes com o genótipo W1/W1 foi de 66,67% (20/30), de 26,66% (08/30) para o genótipo W1/m1 e para o genótipo m1/m1 foi de 6,67% (02/30). As freqüências dos genótipos polimórficos W1/m1 e m1/m1 é maior nas pacientes com endometriose de acordo com a classificação no Grau III ou Grau IV comparando com as pacientes do Grau I/Grau II, não significante,  $p = 0,452$ .

Tabela XIV – Distribuição da freqüência dos genótipos do gene *CYP1a1m1* comparando com a classificação da endometriose (Grau I/Grau II / ou Grau III/Grau IV).

Grupos Endometriose	Genótipos			X <sup>2</sup>	GL	p
	W1/W1(n)%	W1/m1(n)%	m1/m1(n)%			
Grau I/II (n=22)	(15)68,19	(07)31,81	00			
Grau III/IV(n=30)	(20)66,67	(08) 26,66	(02) 6,67	1,588	2	0,452

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências alélicas do gene *CYP1A1m1* (tabela XV) comparando com a classificação da endometriose Grau I/II e Grau III/IV verificou-se que para as pacientes com os alelos W1/W1 foi de 68,19% (30/44), para os alelos W1/m1 foi de 31,81% (14/44) e para os alelos m1/m1 foi de 0,0% (0,0/44). Para o Grau III /Grau IV as pacientes com os alelos W1/W1 foi de 66,67% (40/60), de 26,66% (16/60) para os alelos W1/m1 e para os alelos m1/m1 foi de 6,67% (04/60). As freqüências dos alelos polimórficos W1/m1 e m1/m1 são mais freqüentes nas pacientes com endometriose de acordo com a classificação no Grau III ou Grau IV comparando com as pacientes do Grau I/Grau II, não significante,  $p = 0,204$

Tabela XV – Distribuição da freqüência dos alelos do gene *CYP1a1m1* comparando com a classificação da endometriose (Grau I/Grau II / ou Grau III/Grau IV).

Grupos Endometriose	Genótipos			X <sup>2</sup>	GL	p
	W1/W1(n)%	W1/m1(n)%	m1/m1(n)%			
Grau I/II (n=44)	(30) 68,19	(14) 31,81	00			
Grau III/IV(n=60)	(40) 66,67	(16)26,66	(04)6,67	3,176	2	0,204

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas

pacientes férteis (tabela XVI) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi 79,16% (19/52), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 16,67% (04/52) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 4,17% (01/52). As freqüências genotípicas nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 55,56% (15/27), de 40,74% (11/27) com o genótipo W1/m1 e de 3,70% (01/27) com genótipo homocigoto mutante m1/m1. As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 85,72% (36/42), de 14,28% (06/42) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/42) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas entre as pacientes inférteis foi maior comparado com as pacientes férteis, diferença significativa,  $p= 0,053$ .

Tabela XVI - Freqüência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) comparando com o grupo controle.

Genótipo	Férteis (n)%	Inférteis(n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(19) 79,16	(15) 55,56	(36) 85,72			
W1/m1	(04) 16,67	(11) 40,74	(06) 14,28	9,306	4	0,053
m1/m1	(01) 4,17	(01) 3,70	(00) 00			
Total	(24) 100	(27) 100	(42) 100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis com endometriose que fazem uso anticoncepcional (tabela XVII) para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 92,85% (13/14), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 7,15% (01/14) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/14). As freqüências nas pacientes sem com endometriose que fazem uso anticoncepcional para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 88,89% (14/15), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 7,15% (01/15) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/15). Diferença insignificante,  $p= 0,367$

As freqüências genotípicas nas pacientes férteis com endometriose que não faz o uso do anticoncepcional (tabela XVII) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 60% (06/10), de 40% (04/10) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/10) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 81,48% (22/27), de 18,52% (05/27) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/27) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas heterocigotas

nas pacientes sem endometriose (grupo controle) que não usam o anticoncepcional foi maior comparado com as pacientes com endometriose que não fazem o uso, no entanto, a diferença foi insignificante,  $p= 0,357$ .

Tabela XVII - Frequência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (endometriose) (pacientes férteis) e o uso de anticoncepcional comparando com o grupo controle.

Genótipo	Férteis (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(13)92,85	(14) 88,89			
W1/m1	(00) 00	(01) 11,11	2,005	2	0,367
m1/m1	(01) 7,15	(00) 00			
Total	(14) 100	(15) 100			
Não uso					
W1/W1	(06) 60	(22) 81,48			
W1/m1	(04) 40	(05) 18,52	1,829	1	0,357
m1/m1	(00) 00	(00) 00			
Total	(10) 100	(27) 100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As frequências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis que praticam atividade física (tabela XVIII) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 82,36% (14/17), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 11,76% (02/17) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 5,88% (01/17). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 60% (09/15), de 33,34% (05/15) com o genótipo W1/m1 e de 6,66% (01/15) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As frequências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 88,89% (24/27), de 11,11% (03/27) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/27) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). Não houve diferença significativa,  $p= 0,329$ .

As frequências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis que não praticam atividade física (tabela XVIII) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 82,36% (14/17), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 11,76% (02/17) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 5,88% (01/17). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 60% (09/15), de 33,34% (05/15) com o genótipo W1/m1 e de 6,66% (01/15) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As

freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 80% (12/15), de 20% (03/15) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/15) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). Não significativa, com o  $p= 0,159$ .

Tabela XVIII - Freqüência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) que praticam atividade física comparando com o grupo controle.

Genótipo	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n)%	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(14)82,36	(09)60,00	(24)88,89	2,220	2	0,329
W1/m1	(02)11,76	(05)33,34	(03)11,11			
m1/m1	(01)05,88	(01)06,66	(00)00			
Total	(017)100	(15)100	(27)100			
Que não praticam atividade física						
W1/W1	(05) 71,42	(06) 55,56	(12) 80	3,668	2	0,159
W1/m1	(02) 28,57	(07) 40,74	(03) 20			
m1/m1	(00) 00	(00) 00	(00) 00			
Total	(07) 100	(13) 100	(15) 100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis e o tabagismo (tabela XIX) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 100 (01/01), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/01). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 100% (02/02), de 0% (0/02) com o genótipo W1/m1 e para o genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 100% (03/03), de 0% (0/02) para o genótipo W1/m1 e genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas entre as pacientes sem endometriose foi maior comparado com as pacientes férteis e inférteis com endometriose, porém, não houve há como analisar esta diferença devido o pequeno número de fumantes.

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis e o não uso do tabaco (tabela XIX) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 78,26% (18/23), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 17,39% (04/23) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 4,35% (01/23). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem W1/W1 foi de 50% (13/26), de 46,15% (12/26) com o genótipo W1/m1 e 3,85% (01/26) para

o genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 84,61% (33/39), de 15,39% (06/39) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/39) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). Diferença significativa, com o  $p= 0,025$ .

Tabela XIX - Freqüência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) e o tabagismo comparando com o grupo controle.

Genótipo	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n)%	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(01)100	(02)100	(03)100			
W1/m1	(00)00	(00)00	(00) 00	0	0	0
m1/m1	(00)00	(00)00	(00) 00			
Total	(01)100	(02)100	(03)100			
Não uso de tabaco						
W1/W1	(18)78,26	(13)50,00	(33)84,61			
W1/m1	(04)17,39	(12)46,15	(06)15,39	7.330	2	0,025
m1/m1	(01)04,35	(01)03,85	(00)00			
Total	(23)100	(26)100	(39)100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis têm hábito de beber (tabela XX) com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 100% (04/04), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) e o homocigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/04). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 100% (01/01), de 0% (0/01) com o genótipo W1/m1 e para o genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 76,93% (10/13), de 23,07% (03/13) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/13) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). Não significativa, com o  $p= 0,838$ .

As freqüências genotípicas (tabela XX) do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis que não tem hábito de beber com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 75% (15/20), para o genótipo do heterocigoto (W1/m1) foi de 20% (04/20) e do homocigoto mutante (m1/m1) foi de 5% (01/20). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homocigoto selvagem W1/W1 foi de 51,85% (14/27), de 44,45% (12/27) com o genótipo W1/m1 e de 3,70% (01/15) com genótipo homocigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homocigoto selvagem (W1/W1) foi de 89,65% (26/29), de 10,35% (03/29) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/29) com genótipo

homozigoto mutante (m1/m1). Significante,  $p= 0,009$ .

Tabela XX - Frequência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (endometriose) (pacientes férteis e não férteis) e o etilismo comparando com o grupo controle.

Genótipo	Férteis (n) %	Inférteis (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(04)100	(01)100	(10)76,93			
W1/m1	(00)00	(00)00	(03)23,07	1,435	4	0,838
m1/m1	(00)00	(00)00	(00)00			
Total	(04)100	(01)100	(13)100			
Não uso de álcool						
W1/W1	(15)75,00	(14)51,85	(26)89,65			
W1/m1	(04)20,00	(12)44,45	(03)10,35	17,039	6	0,009
m1/m1	(01)05,00	(01)03,70	(00) 00			
Total	(20)100	(27)100	(29)100			

Valor do  $P \leq 0,05$ .

As frequências genotípicas (tabela XXI) do gene da p53 em pacientes com endometriose para a variante Arg/Arg de 36,54% (19/52). Já para o genótipo Arg/Pro, de 57,69% (30/52) e para o genótipo Pro/Pro foi de 5,77% (03/52). As frequências genotípicas no grupo controle para a variante Arg/Arg de 57,14% (24/42), para o genótipo Arg/Pro 42,86% (06/42) e de 0,05 para o genótipo Pro/Pro. As frequências dos genótipos Pro foi maior entre as pacientes com endometriose comparado com as do grupo controle, insignificante com o  $p = 0,061$ .

Tabela XXI – Distribuição das frequências genotípicas para o gene da p53 caso (endometriose) X grupo controle

Genótipo	Endometriose (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	P
Arg/Arg	(19)36,54	(24)57,14			
Arg/Pro	(30)57,69	(18)42,86	5,581	2	0,061
Pro/Pro	(03)05,77	00			
Total	(52)100	(42)100			

valor do  $p \leq 0,05$ .

As frequências alélicas do gene da p53 nas pacientes (tabela XXII) com endometriose ( $n = 104$ ) para o alelo Arg 36,54% (38/104) e de 63,46 % (66/104) para o alelo Pro. As frequências do grupo controle ( $n=84$ ) para o alelo Arg 57,14% (48/84) e para o alelo Pro de 42,86% (36/84). As frequências dos alelos Pro foi maior entre as pacientes com endometriose comparado com grupo controle, diferença significativa,  $p= 0,007$ .

Tabela XXII - Distribuição das freqüências alélicas para p53 caso (endometriose) X grupo controle

Genótipo	Endometriose (n) %	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	P
Arg	(38) 36,54	(48) 57,14	7,949	1	0,007
Pro	(66) 63,46	(36) 42,86			
Total	(104) 100	(84)100			

valor do  $p \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionado com o gene p53 (Arg/Arg) (tabela XXIII) com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 76,93% (10/13), 23,07% (03/13) para o genótipo do heterozigoto (W1/m1) e para o homozigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/13). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 28,58% (02/07), de 71,42% (05/07) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/07) para o genótipo homozigoto mutante (m1/m1). As freqüências genotípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 95,84% (23/24), de 4,16% (01/24) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/24) com genótipo homozigoto mutante (m1/m1). Significante, com o  $p = 0,0005$ .

Tabela XXIII - Freqüência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando com o gene p53.

			Arg/Arg			
Genótipo	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n) %	X <sup>2</sup>	GL	p
W1/W1	(10)76,93	(02)28,58	(23) 95,84	15,147	2	0,0005
W1/m1	(03)23,07	(05)71,42	(01) 04,16			
m1/m1	(00)00	(00)00	(00) 00			
Total	(13)100	(07)100	(24) 100			

			Arg/Pro + Pro/Pro			
W1/W1	(11)91,67	(12)60,00	(13)72,23	6,373	4	0,172
W1/m1	(00)00	(07)35,00	(05)27,77			
m1/m1	(01)08,33	(01)05,00	(00)00			
Total	(12)100	(20)100	(18)100			

Valor do  $p \leq 0,05$ .

As freqüências genotípicas (Tabela XXIII) do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionado com o gene p53 (Arg/Arg) com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 91,67% (11/12), 0% (0/12) para o

genótipo do heterozigoto (W1/m1) e para o homozigoto mutante (m1/m1) foi de 8,33% (01/12). Nas pacientes inférteis (Tabela XXIII) com endometriose para o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 60% (12/20), de 35% (07/20) com o genótipo W1/m1 e de 5% (01/20) para o genótipo homozigoto mutante (m1/m1). As freqüências genótípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 72,23% (13/18), de 27,77% (05/18) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/18) com genótipo homozigoto mutante (m1/m1). Não significativa, com o  $p= 0,172$ .

As freqüências genótípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionado em mulheres de cor branca (tabela XXIV) com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 86,36% (19/22), para o genótipo do heterozigoto (W1/m1) foi de 09,09% (02/22) e do homozigoto mutante (m1/m1) foi de 4,55% (01/22). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homozigoto selvagem W1/W1 foi de 65,22% (15/23), de 30,44% (07/23) com o genótipo W1/m1 e de 3,34% (01/23) com genótipo homozigoto mutante (m1/m1). As freqüências genótípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 84,35% (27/32), de 15,62% (05/32) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/32) com genótipo homozigoto mutante (m1/m1). Não significativa,  $p= 0,262$ .

Tabela XXIV –Frequência genotípica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando com a cor da paciente.

Genótipo	Cor Branca			X <sup>2</sup>	GL	p
	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n)%			
W1/W1	(19) 86,36	(15) 65,22	(27) 84,38	5,256	4	0,262
W1/m1	(02) 09,09	(07) 30,44	(05) 15,62			
m1/m1	(01) 04,55	(01) 04,34	(00) 00			
Total	(22) 100	(23) 100	(32) 100			

Genótipo	Cor Não branca			X <sup>2</sup>	GL	p
	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n)%			
W1/W1	(00) 00	(03) 75,00	(04) 80,00	2,619	2	0,269
W1/m1	(01) 100	(01) 25,00	(01) 20,00			
m1/m1	(00) 00	(00) 00	(00) 00			
Total	(01) 100	(04) 100	(05) 100			

Valor do  $p \leq 0,05$

As freqüências genótípicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionada em mulheres de cor não branca (tabela XXIV) com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 0% (0/01), para o genótipo do heterozigoto (W1/m1) foi de 100% (01/01) e do homozigoto mutante (m1/m1) foi de 0% (0/01). Nas pacientes inférteis com endometriose para o genótipo homozigoto selvagem W1/W1 foi de 75% (03/04), de 25% (01/04) com o genótipo W1/m1 e 0% (0/04) para o genótipo homozigoto mutante (m1/m1). As freqüências genótípicas nas pacientes sem endometriose com o genótipo homozigoto selvagem (W1/W1) foi de 80% (04/05), de 20% (01/05) com o genótipo W1/m1 e de 0% (0/05) com genótipo homozigoto mutante (m1/m1). Não significativa, com o  $p= 0,269$ .

As freqüências alélicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionada em mulheres de cor branca (tabela XXV) com o alelo selvagem (/W1) foi de 86,36 (38/44), para o alelo mutante (m1) 13,64% (06/44). Nas pacientes inférteis com endometriose para o alelo selvagem (/W1) foi de 65,22% (30/46), de 34,78% (16/46) com o alelo mutante (m1). As freqüências alélicas nas pacientes sem endometriose com o alelo selvagem (/W1) foi de 84,38% (54/64), de 15,62% (10/64) para o alelo mutante (m1). Significante, com o  $p= 0,019$ .

Tabela XXV – Freqüência alélica do gene *CYP1A1m1* entre os casos (pacientes férteis e não férteis com endometriose), grupo controle (sem endometriose) correlacionando quanto à cor da paciente.

Cor Branca						
Genótipo	Férteis (n)%	Inférteis (n)%	Controle (n)%	X <sup>2</sup>	GL	p
W1	(38)86,36	(30)65,22	(54)84,38			
m1	(06)13,64	(16)34,78	(10)15,62	7,876	2	0,019
Total	(44)100	(46)100	(64)100			
Cor Não branca						
W1	(00)00	(06)75,00	(08)80,00			
m1	(02)100	(02)25,00	(02)20,00	5,238	2	0,072
Total	(02)100	(08)100	(10)100			

Valor do  $p \leq 0,05$ .

As freqüências alélicas do polimorfismo do gene *CYP1A1m1* nas pacientes férteis correlacionada em mulheres de cor não branca (tabela XXV) com o alelo selvagem (W1) foi de 0% (0/02), para o alelo mutante (m1) foi de 100% (02/02). Nas pacientes inférteis com endometriose o alelo selvagem (W1) foi de 75% (06/08), de

25% (02/08) para o alelo mutante (m1). As freqüências genóticas nas pacientes sem endometriose com o alelo selvagem (W1) foi de 80% (08/10), de 20% (02/10) para o alelo mutante (m1). Não significante, com o  $p= 0,072$ .

Para reavaliar os resultados obtidos neste estudo foi feito o teste de sensibilidade o qual obteve 70% nas pacientes com endometriose e 37% de especificidade. O valor preditivo positivo foi de 36% e o valor preditivo negativo foi de 42%. Indicando que o gene *CYP1A1m1* é um biomarcador importante e pode auxiliar nos estudos em mulheres com pré-disposição a doença de endometriose.

## 6 – DISCUSSÃO

A infertilidade é um dos principais sintomas associados com a endometriose e quase metade das mulheres com endometriose são inférteis (Guo & Wang, 2006). Neste trabalho foram estudados os genótipos de *CYP1A1m1* (polimorfismo  $T \rightarrow C$ ), em 52 amostras de pacientes com endometriose e em 42 sem endometriose (controle).

Este estudo analisou pacientes com idades entre 25 e 35 anos com endometriose, o qual mostrou que a idade média das pacientes com risco maior de infertilidade foi de 30,23 anos. Esses resultados vão de encontro com os de Moura *et al* (1999) o qual relatou que a idade média em que se tem o diagnóstico da endometriose é de 31 anos. Outro autor Pritts *et al* (2003) relatou que a idade média em que se tem o diagnóstico da endometriose é de 28 anos. A análise das pacientes sem endometriose (grupo controle) revelou uma média de idade (37,38) sendo esta diferença aproximadamente quatro (04) vezes maior em relação ao grupo pacientes com endometriose, significativo, porém estas pacientes não possuem sintomas de endometriose.

A análise dos dados deste trabalho revelou diferenças significativas entre a endometriose e o alelo polimórfico m1 nas mulheres com endometriose, sendo duas delas homozigotas mutantes quando comparadas ao grupo controle. Nakata e colaboradores (2004) analisaram 25 pacientes com diagnóstico de endometriose e 25 sem a doença (grupo controle). A frequência obtida entre os dois grupos indicou ausência de associação do alelo polimórfico *CYP1A1m1* com a endometriose, observou a frequência alélica superior nas mulheres com endometriose quando confrontada ao grupo controle. Duas pacientes com a doença foram homozigotas para o alelo m1, no entanto essa diferença não foi significativa. Em contraste com Babu *et al* (2005) num estudo com 310 mulheres indianas com endometriose e 215 controles foram analisadas e não encontraram associação entre a endometriose e o polimorfismo do gene *CYP1A1*.

O estudo revelou que os genótipos estudados (m1) não foi significativo quando comparados com a classificação da endometriose. Não houve diferenças entre as pacientes com grau I/II quando comparadas com os graus III/IV. No entanto as frequências genótípicas m1 foram mais frequentes nas pacientes que corresponderam à severidade da doença, estes dados vão ao encontro com a

classificação da endometriose nos graus III/IV, resultados estes que também estão presentes em mulheres férteis com endometriose com os mesmos graus receptivamente. O que sugere que, esse polimorfismo pode, também, influenciar a sua progressão para a forma grave.

As combinações genótípicas do gene estudado com o do códon 72 do gene *p53*, a existência de uma correlação entre os polimorfismos dos genes e a endometriose. As frequências dos genótipos Pro foi maior entre as pacientes com endometriose comparado com as do grupo controle. Os dados revelaram a frequência dos genótipos *Arg/Arg*, a análise estatística não revelou diferença significativa para ambos os genes, quando comparados aos genótipos selvagens. Corroborando com Ribeiro Júnior (2009) que analisou 38 mulheres diagnosticadas com endometriose e o polimorfismo *p53*, não encontrou diferença significativa entre o polimorfismo *p53* no códon 72 e a endometriose, de acordo com o pesquisador a arginina atuaria como fator de proteção para endometriose e a presença do alelo prolina, seja em heterozigose (*PRO/ARG*) ou homozigose (*PRO/PRO*), seria responsável pela suscetibilidade do desenvolvimento da endometriose. Quando comparado as frequências do alelo Pro notou-se houve um significância maior entre pacientes e o grupo controle.

Quanto aos fatores de risco dos alelos do gene *CYP1A1* são mais freqüentes nas portadoras de endometriose que usa anticoncepcional. Foi observada diferença significativa na comparação entre portadoras de endometriose em relação ao controle. Estes resultados podem estar relacionados ao fato dos anticoncepcionais bloquearem a produção de estrogênio. Segundo Hatagima (2002) o estrogênio é um hormônio esteróide, reconhecido como regulador do crescimento, da diferenciação e do metabolismo, de interferir com o funcionamento normal do sistema endócrino, de alguma forma, afetar a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios no organismo, os quais são responsáveis, pela reprodução, desenvolvimento e podem estar envolvidos na indução dos cânceres de mama e na endometriose. Em contrapartida Ramos-Vara & Miller (2006) ressaltam que o uso de anticoncepcionais orais continuo podem acarretar diminuição na fertilidade mesmo que depois de interrompido o tratamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que não houve diferenças estatísticas entre os genótipos estudados e a prática de atividades físicas

com o risco da endometriose. Estes dados corroboram com os encontrados por Cramer *et al* (1986) quando analisou a relação entre endometriose a prática de atividades físicas, o autor constatou uma redução no risco de endometriose em mulheres que praticavam atividades físicas, a melhora se mostrou àquelas mulheres com alta freqüência de atividade física no período que antecederam o estudo. Segundo o autor a atividade física regular parece estar relacionada a baixos níveis de estrogênios e, conseqüentemente, pode reduzir o risco de desenvolvimento dessa doença.

Os resultados das análises do gene *CYP1A1m1* não mostraram significância entre o consumo de bebidas alcoólicas e endometriose. Estes achados devem ser confirmados para um melhor esclarecimento da importância deste gene candidato a endometriose, devido ao pequeno tamanho da amostra disponível para esta análise (05 amostras de pacientes com endometriose). Recentemente foi reportado por Ribeiro Júnior, (2009) que o consumo comedido de álcool aumenta os níveis de estrógeno, contribuindo para o desenvolvimento da endometriose e tem relacionado o consumo de bebidas alcoólicas com a causa anovulatória com aumento da infertilidade e devido à endometriose.

Este estudo não mostra o risco do polimorfismo do gene *CYP1A1* em pacientes com endometriose em relação ao tabagismo, o tamanho da amostra do estudo não foram considerados, devido os fumantes serem representados por um número significativamente reduzido de mulheres (em torno de 4% do número total) provavelmente fazendo com que esses dados sejam insuficientes para fornecer informações consistentes sobre a relação do tabaco com a endometriose. Mesmo assim, os resultados aqui apresentados estão de acordo com Parazzini *et al.* (1989) que não observou nenhuma diferença significativa entre fumantes e não-fumantes, quanto à incidência de endometriose ovariana, segundo o autor o fumo é apresentado em alguns trabalhos como um protetor para a mulher, o seu efeito sobre o meio hormonal causa uma diminuição dos níveis de estrógeno, e assim os fumantes tenham menores níveis de estrógeno, servindo como um agente protetor da endometriose. Portanto, apesar dos resultados aqui obtidos não terem demonstrado a influência do polimorfismo estudado entre fumantes, não sendo possível destacar o papel desse polimorfismo para o risco da doença. Uma vez que o gene *CYP 1A1* possui uma atividade catalítica importante sobre inúmeras PHAs,

incluindo o benzo(a)pireno encontrado na fumaça do tabaco (Cascorbi, 2006).

As análises deste trabalho não revelaram diferenças quanto à cor da pele das pacientes, talvez seja devido ao pequeno número de amostras de mulheres analisadas. Quem sabe ampliando o número de amostras possa fornecer uma melhor compreensão da relação entre a população-específica. As diferenças das freqüências dos genótipos e das variantes alélicas m1, nos dados desta análise é que a significância se deveu ao baixo número de amostras referidas quanto da cor não branca.

## 7- CONCLUSÃO

- O trabalho confirmou a importância do estudo polimórfico do gene *CYP1A1m1* correlacionados com a endometriose.
- Constatou uma associação significativa entre a endometriose e os alelos polimórficos do gene *CYP1A1m1* nas mulheres com endometriose.
- Não houve diferenças entre as pacientes nos grau I/II e nos grau III/IV quando comparadas com os alelos polimórficos do gene *CYP1A1m1*.
- Foi observada uma correlação entre os polimorfismos dos genes estudados: do códon 72 do gene *p53* e o gene *CYP1A1m1* com a endometriose.
- O gene *CYP1A1m1* não obteve significância correlacionada quanto ao uso de anticoncepcional com a endometriose.
- Não houve diferenças entre os genótipos W1/m1 e m1/m1 quanto à prática de atividades físicas com a susceptibilidade a endometriose.
- O gene *CYP1A1m1* não mostrou significância em relação ao consumo de bebidas alcoólicas e a endometriose.
- Os dados obtidos demonstram que o tabaco não exerceu influência entre as pacientes fumantes com a susceptibilidade a endometriose.
- Não houve diferença quanto à cor das pacientes entre o polimorfismo m1 e a endometriose.
- Conclui-se que os polimorfismos W1/m1 e m1/m1 estão mais frequentes no grupo das pacientes com infertilidade as quais estão também com o diagnóstico mais severo de acordo com o quadro clínico da doença.
- Os resultados aqui encontrados poderão contribuir para um novo prognóstico e ajudar no diagnóstico em mulheres inférteis com endometriose.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão, MS. Endometriose, uma visão contemporânea. Editora Revinter; 1a edição: 257-35; 2000.

Abrão MS; Neme RM; Carvalho FM; Adrighi JM; Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet.* 2:31-40; 2003.

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

ABEND – Associação Brasileira de Endometriose. [www.abend.org.br](http://www.abend.org.br) Acessado dia 04/05/2009.

Ackerman GE; Smith ME; Mendelson CR; Mac Donald PC; Simpson ER. Aromatization of Androstenedione by Human Adipose Tissue Stromal Cells in Monolayer Culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 53:412-17; 1981.

Adashi EY; Rock JA; Rozenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.* Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia; 1996.

*American Fertility Society* (Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis. *Fertil Steril;* 43:351-2; 1985.

Anttila, S; Hietanen, E; Vainio, H; Camus, AM; Gelboin, HV; Park SS; Heikkila, L; Karjalainen, A; Bartsch, H. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450 in lung cancer patients. *International Journal of Cancer,* 47: 681-685; 1991.

Arvanits DA; Goumenou AG; Matalliokis I M; Komantakis EE; Spandidos D A. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril.*76:1202-1206; 2001.

Autrup, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research,* 464:65-76; 2000.

Babu, K; Reddy, NG; Deendayal, M; Shivaji, S; GSTM1, GSTT1 and *CYP1A1* detoxification gene polymorphisms and their relationship with advanced stages of endometriosis in South Indian women. *Pharmacogenet Genomics.* 5(3): 167-172; 2005.

Bankowski, BJ. *Manual de Ginecologia e Obstetrícia do Johns Hopkins.* 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Barros, A e Sousa, M. “Reprodução medicamente assistida na infertilidade de causa masculina”. in *Andrologia Clínica.* Sociedade Portuguesa de Andrologia (Ed), Cap.II, 157-162, 2000.

Berek, MP. Endometriose. Painel de Humanas. São Paulo: Cortez, 2005; Chaves Netto, Hermógenes. Obstetrícia Básica. São Paulo: Atheneu, 2005.

brnoticias: <http://brnoticias.com/endometriose-sintomas-diagnostico-e-tratamento-video/>, acessado dia 03/05/2010.

Brosens, IA. New principles in the management of endometriosis. Acta Obstet Gynecologic Scand suppl. 159: 18-21, 1994.

Carstensen, U; Alexandrie, AK; Hogstedt, B; Rannug, A; Bratt, I; Hagmar, L. B- and T- lymphocyte micronulei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for *CYP1A1* and *GSTT1* (class Mu). Mutation Research, 289:187-195, 1993.

Carvalho CV; D' Amota P; Sato H; Girão M J BC; Lima G R; Silva IDG; Schor E. polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose pélvica. RBGO; 2004.

Cascorbi, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. Toxicology Letters, 162: 16-28, 2006.

Coeman, V; Sciot, R; Breuseghem, V. Rectus abdominis endometriosis: a report of two cases. Br J Radiol, London, v.78, p.68-71, January, 2005.

Conforti, NDT. Suscetibilidade Genética ao Câncer. In: Ferreira, C.G.; Rocha, JC (org.) Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu, 295-305 - 2004.

Cotran RS. Patologia Estrutural e Funcional. 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara - 2000.

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. J Am Med Assoc; 255:1904-8 - 1986.

Donadio, Nilson. Consenso Brasileiro em Videoendoscopia Ginecológica. São Paulo: Artes Médicas – 2001.

Donnez J; Nisolle M. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the recto vaginal septum are three different entities. Fertil Steril; 68:585-596 - 1997.

Duleba, AJ. Diagnóstico da endometriose. Clin Obstet Ginecol Am Norte, Washington, v.2, p.311-325 - 1997.

Dwivedi, AJ; Agrawal, SN; SILVA, YJ. Abdominal wall endometrioma. v.47, n.2, p.456-461, February - 2002.

Eskenazi B; Warner ML. Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am; 24:235-58 - 1997.

Faria, J. L. Patologia Especifica com aplicação Clinicas. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara - 1999.

Gianetto-Berrutti A; Feyles V. Endometriosis related to infertility. *Minerva Ginecol*; 55:407-16 - 2003.

Giordano, MG - *Ginecologia Endócrina e da Reprodução*. Fundo Editorial BYK, São Paulo, p 225 - 1998.

Gordon, CW; Krishna, BS. Cesarean scar endometriosis: a review. *Obstet Gynecol Surv*, London, v. 44, n.2, p. 89-95 – 1989.

Greenblatt, MS; Bennet, WP; Hollstein, M. & Harris, CC. Mutations in p53 suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54:4855-4878 - 1994.

Guo, SW; Wu, Y; Strawn, E; Basir, Z; Wang, Y; Halverson, G; Montgomery, K; Kajdacsy-Balla, A. Genomic alterations in the endometrium may be a proximate cause for endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.116, n.1, p.89-99, Sep 10 - 2004.

Guo SW; Wang, Y. Sources of heterogeneities in estimating the prevalence of endometriosis in infertile and previously fertile women. *Fertil Steril*; 86:1584–1595; 2006.

Hadfield RM; Manek S; Weeks DE; Mardon HJ; Barlow DH; Kennedy SH. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. *Mol Hum Reprod*. 7:1073– 8 - 2001.

Harris, CC. The p53 tumor suppressor gene: At the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. *Science*, 262: 1981.

Harrison, Robert F. M.D.; Barry-Kinsella, Carole M.D. Efficacy of medroxy progesterone treatment in infertile women with endometriosis: a prospective, randomized, placebo controlled study. *Fertil Steril*. 74:24-30 - 2000.

Hatagima, A. Polimorfismos genéticos e metabolismo dos desreguladores endócrinos na suscetibilidade ao câncer. *Cadernos de Saúde Pública*, 18: 357-377 - 2002.

Hayes, JD; Flanagan, JU & Jowsey, IR. Glutathione –S -transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 5: 51-88 - 2005.

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.

Hemmink, K. Biomarkers of exposure and effect for carcinogenicity. *IPCS 222 – appendix I*: 47-94 - 2001.

Houston DE; Noller KL; Melton LJ. The epidemiology of pelvic endometriosis. *Clin Obstet Gynaecol.* 31:787-800 – 1988.

Jubanyik, KJ; Comite EF. Extrapelvic endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am, New York*, v.24, n.2, p.411-440, June - 1997

Kalant, K; Roschlau, WHE; Silva, P. Biotransformação das drogas. In *Princípios de Farmacologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.30-40 - 1991.

Kennedy S; Mardon H; Barlow D. Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 12:32-4 - 1995.

Kirshon B; Poindexter AN; Fast J. Endometriosis in multiparous women. *J Reprod Med – 1989.*

Kistner, RW. *Tratado de Ginecologia Segunda Edição, Ediciones Toray, Barcelona*, p.830 - 1983.

Kitawaki J; Kusuki I; Koshiba H; Tsukamoto K; Fushiki S; Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril.* 72:1100-6 – 1999.

Kondo, W. [drwilliamkondo.site.med.br](http://drwilliamkondo.site.med.br) . Acessado dia 09/08/2010.

Lewis, D. F. V., and Sheridan, G. Cytochrome P450, origen, and evolution. *Scientific World.* 1, 151-167 - 2001.

Lorencatto, C; Vieira, NJM; Pinto, BLC; Petta AC. Avaliação da freqüência de depressão em pacientes com endometriose e dor pélvica. *Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo*, v. 48, n. 3, p.217-221, 2002

McDonnel, WM; Scheiman, JM; Traber, PG. Induction of cytochrome p4501A genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology*, 103:1509-1516, 1992.

Moura, MD; Negreiros TP; Nogueira, AA; Ferriani, R AI; Sala, M M; Reis, RM. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. *RBGO* . 21 (2): 85-90, 1999.

Mullis, Kary, "A origem incomum da reação em cadeia da polimerase." *Scientific American* 262 (4): 56-61, 64-5, 1990.

Nakata, LC; Bertollo, EMC; Dos Santos, I; Oliani, AH; Vaz, DCM; Oliveira, GH; Bertelli ,ECP. *Biomarcadores de Susceptibilidade à Endometriosis*. *RBGO*, V.26, N°4, 2004.

NCBI. The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. Acessado dia 03/08/2009.

Nelson, DR. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, v. 6, n. 1, p. 1-42, Feb. 1996.

Noble LS; Takayama K; Zeitoun KM. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:600-6; 1997.

Parazzini F; La Vecchia C; Franceschi S; Negri E; Cecchetti G. Risk factors for endometrioid, mucinous and serous benign ovarian cysts. *Int J Epidemiol*; 18:108-12; 1989 .

Patterson, GK; Winburn, GB. Abdominal wall endometriomas: Report of eight cases. *The Am Surg, Ph Kopecky iladelphia*, v.65, n.1, p.36-39, January, 1999.

Pemble, S, Schroeder, KR; Spence, SR; Meyer, DJ; Hallier, E; Bolt, HM; Ketterer, B & Taylor, JB. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and characterization of genetic polymorphism. *Biochemical Journal* 300: 271-276; 1994.

Petta, CA. Avaliação da frequência de depressão em pacientes com endometriose e dor pélvica. *Rev. Assoc. Médica Brasileira*. v. 48, n. 3, p. 217-221, 2002.

Podgaec S; M S Abrão; Dias Jr JALV; Rizzo, R M. de Oliveira, C E Baracat. Endometriose: uma doença inflamatória, com uma componente de resposta imuneTh2. *Hum Reprod*. 22 (5): 1373-9; 2007.

Pritts EA, MD; Taylor RN; PhD, MD. An evidence-based evaluation of endometriosis associated infertility. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 32:653-667; 2003.

Ramos, SP. Endometriose - Doença que causa dor e infertilidade. <http://www.gineco.com.br/endometr.htm>. Acesso em: 05/01/2010.

Ramos-Vara, JA; Miller, MA. Comparison of two polymer based immune histochemical detection systems: envision and impress. *J Microsc*, v. 224, n. Pt 2, p. 135-9, Nov. 2006.

Rani, PR; Soundararaghavan, S; Rajaram, P: Endometriosis in abdominals cars- review of 27 cases. *Int Journal Gynecology Obstetrics, Commons*, v.36, p.215-218, 1991.

Rannug, A; Alexandrie, AK; Person, Ingelman-Sundberg, M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1 A 1, 2 D 6 and 2 E 1: regulation and toxicological significance. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37:25-36, 1995

Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. 29. *Toxicol Sci*. 70(2):161-70; 2002.

Ribeiro Júnior CL. Análise do polimorfismo do gene p53 em pacientes com clínica de endometriose associado à infertilidade [Dissertação de Mestrado em Genética]. Goiânia, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 2009.

Rubin Emanuel. Farber, John L. Patologia. 3. ed. São Paulo: Guanabara, 2002.

Russel W W. Aberrant portions of the Mullerian duct found in an ovary Ovarian cysts of Mullerian origin. Bull John Hopkins Hosp. 10: 8-10, 1899.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol;14:422-69, 1927.

Seydel, AS. Extrapelvic endometriosis: diagnosis and treatment. Am J Surg, Bethesda, v.171, p.239-241, February, 1996.

Shastry, B S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. Pharmacogenomics, 6: 16-21, 2006.

Stataloff, DM; LA Vorgna, KA; Mcfarland, MM. Extrapelvic endometriosis presenting as a hernia: clinical reports and review of the literature. Surg Gynecol Obstet, New York, v.110, n.1, p.109-112, January, 1989.

Steck, WD; Helwig, EB Cutaneous endometriosis. J Am Med Assoc, Chicago, v.191, n. 3, p.167-170, January, 1965.

Strange, RC. & Fryer, AA. The glutathione S-transferase: influence of polymorphisms on cancer susceptibility. In: Vineis, P., Malatus, N & Lang, M. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publications N 148. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 231-249; 1999.

Takayama, K., Zeitoun, K., Gunby, RT, Sasano, H. Carr, BR, e Bulun, S E. Treatment of severe post menopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil. O tratamento da endometriose severa pós menopausa com um inibidor da aromatase. Fertil. Steril.* 69, 709–713. *Steril.* 69, 709-713; 1998.

Velebil P, Wingo PA, Xia Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. Obstet Gynecol; 86:764-9; 1995.

Vigano, P; Somigliana, E; Chiodo; I, Abbiati, A; Vercellini, P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. Hum Reprod Update, v.12, n.1, p.77-89, Jan-Feb, 2006.

Walker, CL. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference: Cancer Susceptibility Genes and Molecular Carcinogenesis. Molecular Medicine Today, 2:364-365, 1996.

Wilkinson, J.; Clapper, ML. Detoxification enzymes and chemo prevention. Proceeding Society Experimental Biological Medicine, 216: 192-200; 1997.

Witz CA; Burns WN. Endometriosis and Infertility? Is there a cause and effect relationship ? Gynecol Obstet Invest; 53:2-11; 2002.

Yao HT, Chang YW, Lan SJ, Chen CT, Hsu JT, Yeh TK. The inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on human CYP enzymes. Life Sci;79:2432-40; 2006.

# ANEXOS

ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

ANEXO II – CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

ANEXO III – QUESTIONÁRIO

ANEXO IV – TABELA DE DISCRICÃO LAPAROSCÓPICA DOS LOCAIS AFETADO ENDOMETRIOSE

ANEXO V – CLASSIFICAÇÃO DA ENDOMETRIOSE

ANEXO VI – FOTO DO GEL DO DNA DAS AMOSTRAS DAS PACIENTES EM ENDOMETRIOSE.

ANEXO VII – SUBMISSÃO

ANEXO VIII – ARTIGO CIENTÍFICO

**ANEXO I****PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA E 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 Universidade Católica de Goiás pelo telefone 3946-1071.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Título do Projeto:** Análise do polimorfismo *Mspl* do gene *CYP1A1m1* (*citocromo P450*) e sua possível associação com a infertilidade em portadoras de endometriose.

**Coordenador Responsável:** Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

**Telefones para contatos:** 39467-1385 e 3946-1442

Eu abaixo qualificado, após ser esclarecida verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: **Análise do polimorfismo *Mspl* do gene *CYP1A1m1* (*citocromo P450*) e sua possível associação com a infertilidade em portadoras de endometriose** 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, os quais serão utilizados no objetivo de complementar o meu diagnóstico e de pesquisa.

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 e que serão entregues apenas a mim ou responsável.

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

- Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_
- Assinatura 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  
nº \_\_\_\_\_, CPF nº \_\_\_\_\_, prontuário nº  
\_\_\_\_\_, matrícula nº \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo  
em participar no projeto: Análise do polimorfismo *Mspl* do gene *CYP1A1m1* (*citocromo  
P450*) e sua possível associação com a infertilidade em portadoras de endometriose,  
como sujeito. Fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisador sobre a  
pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios  
decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu  
consentimento a qualquer momento, sem que isto leve 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:

-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 (   )

- Hábitos de vida:

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

→ Fumo (   ) álcool (   )

→ Uso de Anticoncepcional ou contraceptivo: 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:

-Filhos (   ) não

**-Deseja engravidar (   ) sim (   ) não**

**-Tentativas: 1 ano (   ) 2 anos (   ) mais de 2 anos (   )**

Pesquisador:

- RESULTADO ANATOMO-PATOLÓGICO: \_\_\_\_\_

## ANEXO IV

Tabela IX. Descrição laparoscópica dos locais afetados pela endometriose

Peritônio			
Endometriose	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
Superficial	1	2	4
Profunda	2	4	6
Ovário			
D superficial	1	2	4
Profunda	4	16	20
E superficial	1	2	4
Profunda	4	16	20
Obliteração do fundo-de-saco			
	Parcial:4	Completa: 40	
Ovário			
Aderências	<1/3	1/3-2/3	>2/3
D discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
E discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
Trompa			
D discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
E discretas	1	2	4
Intensas	4	8	16
Estadio I ( mínimo ) – 1 a 5 pontos, Estadio II (leve) – 6 a 15 pontos, Estadio III (moderado) – 16 a 40 pontos, Estadio IV (severo) - > 40 pontos			
(FONTE: Giordano 1998).			

## ANEXO V

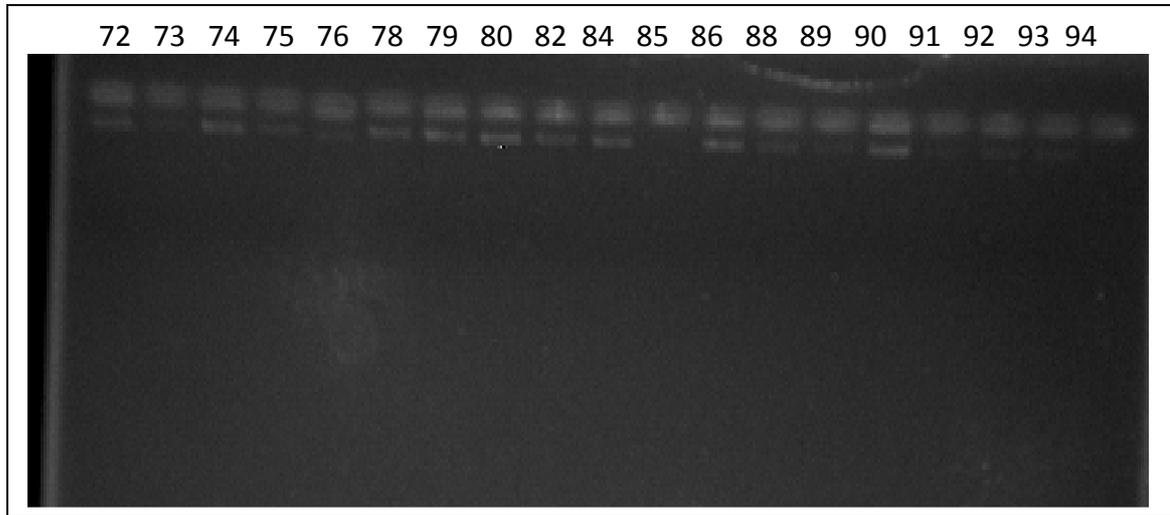
Tabela XVIII – Classificação laparoscópica da endometriose

Endometriose leve
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Lesões recentes, dispersas (implantes não associados a cicatrizes ou retrações do peritônio) no fundo-de-saco anterior, posterior ou no peritônio pélvico</li> <li>-Raros implantes na superfície do ovário, sem endometrioma, sem cicatriz superficial ou retração</li> <li>- Sem aderências periovarianas</li> <li>- Sem aderências peritubáricas</li> </ul>
Endometriose moderada
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Endometriose envolvendo um ou ambos os ovários com grandes lesões superficiais, com cicatriz e retração ou pequenos endometriomas</li> <li>- Aderências periovarianas mínimas associadas a lesões ovarianas</li> <li>- Aderências peritubáricas mínimas associadas a lesões ovarianas</li> <li>- Implantações superficiais no fundo-de-saco anterior ou posterior, ou ambos, com cicatriz e retração. Algumas aderências, porém sem invasão de sigmóide</li> </ul>
Endometriose severa
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Endometriose envolvendo um ou ambos os ovários com endometriomas maiores que 2 x 2cm</li> <li>-Um ou ambos os ovários envolvidos inferiormente por aderências associadas à endometriose, com ou sem aderências tubáricas aos ovários</li> <li>-Uma ou ambas as trompas as envolvidas inferiormente ou obstruídas por endometriose, associadas com aderências ou lesões</li> <li>-Obliteração do fundo-de-saco de Douglas por aderências ou lesões associadas com endometriose</li> <li>-Espessamento dos ligamentos uterossacros e lesões do fundo-de-saco de Douglas por endometriose invasora com obliteração deste</li> <li>-Acometimento significativo do intestino ou das vias urinárias.</li> </ul>

(Fonte: Giordano, 1998).

## ANEXO VI

Foto do gel do DNA das amostras das pacientes sem endometriose.



Gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo

## ANEXO VII



**Bentham Science Publishers**

Dear **Mrs. Ribeiro de Souza** ;

Thank you for submitting Online Abstract for the following title published by Bentham Science Publishers .

**\* Current Molecular Medicine**

----- details -----

Date of submission: Wednesday 16 May 2012 05:38:09 PM

Submitted by: Mrs. Suelene Ribeiro de Souza

Email: [eneleusbioo@yahoo.com.br](mailto:eneleusbioo@yahoo.com.br)

-----  
Yours sincerely,  
Bentham Science Publishers

**ANEXO VIII**

*Título:* Association of *MspI* polymorphism of the gene *CYP1A1m1* (Cytochrome P450) in women with endometriosis

*Título:* Associação de *MspI* polimorfismo do gene *CYP1A1m1* (citocromo P450) em mulheres com endometriose

Título resumido: Endometriosis, Gene *CYP1A1*, polimorfismo *MspI*, Infertilidade

Título resumido: Endometriose, Gene *CYP1A1*, *MspI* polymorphism, Infertility

Autores: Suelene Ribeiro de Souza<sup>1,2</sup>; Ariane Bocalleto Frare<sup>1,2</sup>; Rita de Cássia Costa e Silva<sup>1,2,3</sup>; Iasmim Ribeiro da Costa, R I<sup>1,2,3</sup>; Kleber Santiago Freitas e Silva<sup>1,2</sup>; Circoncisto Laurentino Ribeiro Júnior<sup>1,2,5</sup>; Bárbara Mariotto Bordin<sup>1,2,3</sup>; Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura<sup>1,2,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Mestrado em Genética – MGene, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biomedicina – Pontifícia Universidade Católica de Goiás ;

<sup>4</sup> Prof<sup>a</sup>. Dra.- Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

<sup>5</sup>Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana – FÉRTILE, Goiânia, Goiás, Brasil

Instituição: PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA de GOIÁS

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Av. Universitária, 1069

Setor Leste Universitário, Goiânia - GO

Fone (62) 39467-1385 e 3946-1442

kkverolli@pucgoias.edu.br

**Association of *MspI* polymorphism of the gene *CYP1A1m1* (Cytochrome P450) in women with endometriosis**

Souza S R<sup>1,2</sup>; Frare A B<sup>1,2</sup>; Silva C C R<sup>1,2,3</sup>; Costa, R I<sup>1,2,3</sup>; Silva F S K<sup>1,2</sup>; Júnior C L R<sup>1,2,5</sup>; Bordin, B M<sup>1,2,3</sup>; Moura K K V O<sup>1,2,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon. <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Mestrado em Genética – MGene, Goiânia, Goiás, Brasil <sup>3</sup> Departamento de Biomedicina – Pontifícia Universidade Católica de Goiás ; <sup>4</sup> Prof<sup>a</sup>. Dra.- Pontifícia Universidade Católica de Goiás.<sup>5</sup>Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana – FÉRTILE, Goiânia, Goiás, Brasil

**ABSTRACT**

Endometriosis is a disease that affects 10 to 15% women of reproductive age. It is characterized by the presence of endometrial-like tissue outside the uterus. Some definitions claim that the functional ectopic tissue is sensitive to the action of hormones. The severity of endometriosis is based on a system proposed by the American Society for Reproductive Medicine (1985), according to the findings of laparoscopy. Large numbers of genetic polymorphisms have been reported for *CYP1A1*, gene is responsible for enzymes involved in detoxification stage I on the metabolism of xenobiotics, it encodes an isoenzyme which catalyzes the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on phenolic compounds and epoxides. The gene is located on the 15q22-24. The aim of this study was to analyze the frequency of *MspI* polymorphism and its relation to endometriosis. We analyzed 52 samples of peripheral blood of women with endometriosis confirmed by laparoscopy and 42 samples from women without endometriosis (control group). In the first group women were between 25 and 35 years old and in the second they were between 25 and 57 years old. Molecular analysis was performed by PCR (polymerase chain reaction) There was a significant association ( $p = 0.039$ ) between the polymorphic allele m1 and endometriosis (32.70%) compared to the control group (14.29%). Conclusion we that m1 polymorphism is correlated to endometriosis and polymorphisms W1/m1 and m1/m1 are more frequent in patients with infertility and severe endometriosis.

**KEYWORDS:** Endometriosis, *Gene CYP1A*, *MspI* polymorphism, Infertility.

## INTRODUCTION

Endometriosis is a disease that affects women of reproductive age. This pathology is characterized by the presence of endometrial-like tissue (endometrial or stromal glands) identical to the uterine cavity, outside the uterus and they are also sensitive to the action of hormones. Endometriosis affects 10 to 15% of women of reproductive age [1; 2; 3].

The most common type of endometriosis is the pelvic one, and it can be found in other places such as central nervous system, thorax, urinary tract, gastrointestinal tract, extremities and skin tissue, in the pouch of Douglas (behind the uterus), the rectovaginal septum (the tissue between the vagina and the rectum) fallopian tubes, ovaries, bladder and ligaments, liver, spleen, intestine, heart, etc. The main symptoms are dysmenorrhea, dyspareunia, pelvic pain and infertility [2; 4].

The first studies on endometriosis have been conducted in the last century by Sampson in 1927. Based on his clinical experience, Sampson proposed the retrograde menstrual regurgitation of the tubes into the peritoneal cavity, when viable endometrial cells can be transplanted into ectopic sites. In addition to this direct transport of cells, it can also happen by the blood, lymph channels or surgical wound healing [5; 6].

This pathology can be diagnosed by histopathology, but laparoscopy is the gold standard in order to confirm the diagnosis of endometriosis [1].

Endometriosis is classified by the American Fertility Society [7] as: minimum if it has peritoneal spots; mild if it has extensive peritoneal spots or adhesions; moderate if the disease is characterized by deep endometriomas; and severe if it shows posterior Cul-de-Sac obliteration.

The Endometriosis classification system is based on the size, depth of ovarian and peritoneal implants; on the presence, extent and type of adhesions; and on the degree of Cul-de-Sac obliteration. Endometriosis is classified into three main grades: mild, moderate and severe. In the light type of endometriosis the ovaries have surface implants Without the presence of endometriosis or scar tissue, as well as pre-ovarian adhesions [8].

The risk to develop endometriosis for women is seven times higher if they have first degree relatives with endometriosis. The occurrence of endometriosis in first degree relatives is 4.3 to 6.9% and from 0.6 to 2.0% in women who do not

have the disease. In this case it seems to have no association with gene mutations although some authors mention some specific polymorphisms [9; 10].

There are many studies indicating that the cell detoxification is made by enzymes related to cell protection. They show that the inactivation of such xenobiotics and endogenous toxins enable the preservation of cellular integrity, inhibiting at the same time cytotoxic events caused by these substances which could be the source of some diseases like endometriosis [11].

Based on their functional properties, detoxification enzymes are classified into two groups. The phase I enzymes activate the xenobiotic in a more electrophilic state, thus it becomes more reactive. The phase II enzymes are responsible for the activation function performed by the phase I enzymes and then inhibits the formation of electrophilic products. In addition they catalyze the conversion of electrophilic chemicals into inactive conjugates, making them more soluble and then facilitating their excretion [11].

The best known example of phase I enzymes, or activation enzymes are the superfamily of cytochrome P450 (CYPs) which are classified as oxidative enzymes. The most studied genes of phase II enzymes are the superfamily Glutathione-S-transferase (GST) [12].

The *CYP1A1* is a very important gene to the metabolism of carcinogens. It is located on the long arm of chromosome 15 (15q22-24), and there are several patterns of restriction fragment length polymorphism (RFLP). The restriction enzyme *MspI* is produced by a T→C in the non-coding region 3', resulting in a polymorphic allele named m1 [13].

It can be used as a cancer biomarker especially in tumors related to smoking habit because of the isoenzyme that catalyzes the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into phenolic products and epoxides. This fact suggests that the gene is highly polymorphic, due to a punctual mutation thymine / cytosine in the restriction site of *MspI*. High levels of this enzyme would result in a high capacity to activate polycyclic aromatic hydrocarbons, producing highly reactive electrophilic intermediates that could lead to DNA damage [12].

## **MATERIALS AND METHODS**

For this study, 94 samples of 10 ml peripheral blood were collected in order to

perform molecular analysis and genetics. The samples were divided into two groups: 52 with group I samples from patients with confirmed endometriosis by laparoscopy. This group was subdivided into 02 subgroups (A and B). The patients in the subgroup A (24) were complaining of infertility and they had the intention of becoming pregnant. In the group B the Subgroup patients (28) have endometriosis but no intention of becoming pregnant. And a second group (control) consisting of 42 women without any clinical signs of endometriosis. The project was approved by the Research Ethics Committee (REC) in PUC Goiás (Brazil).

After the laparoscopy, patients with endometriosis were classified according to the degree of endometriosis: Stage I (minimum) / Stage II (mild) / Stage III (moderate) / Stage IV (severe).

DNA extraction from blood was performed using the reagent kit "*Wizard Genomic DNA Purification*" (Promega®), following the manufacturer's instructions. The integrity of the DNA was visualized by agarose gel 2%.

PCR-RFLP was carried out in order to detect specific allelic polymorphism of *CYP1A1*m1 gene, with a final volume of 25µl (Table I). The product obtained underwent electrophoresis on agarose gel 2% and electric field of 10 V/cm. It was then stained with ethidium bromide (5µg/mL) and analyzed in the VDS® system (Amersham Biosciences USA). The tests were performed in duplicate [14].

The PCR-RFLP with *CYP1A1* results in an amplification product 340 pb referring to the wild genotype (W1/W1), which is not affected by the restriction enzyme *MspI*, yielding a single band. The homozygous mutant genotype (m1/m1) has a site for the restriction enzyme *MspI*. It cleaves the amplified products forming two bands of 200 bp and 140 bp and the heterozygous genotype (W1/m1) corresponds to three bands of 340, 200 e 140 pb [14].

The study data were analyzed using the statistical calculations of the average, standard deviation and the Mann Whitney test in order to identify differences between groups. For analysis of the frequencies we used the chi-square test. The results were analyzed using the statistical program Start ® 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá/MCT– CNPq). Differences were considered significant when the probability was less than 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTS

The age of patients (Table I) with endometriosis was between 25 and 35 years old, the average was 30,23 years and the standard deviation 2,92. In the control group age was between 19 and 57 years, with the average 37,38 years and the standard deviation 11,36. The control group age average was almost four times (3,89) higher than the group of patients with endometriosis. The difference is significant,  $p= 0,0004$ .

Table I: Comparison of average age in patients with endometriosis and control group (no endometriosis).

Group	n	$\bar{x}$	SD	p
Endometriosis	52	30,23	2,92	0,0004
Control	42	37,38	11,36	

The test value U Mann Whitney,  $p \leq 0.05$ .

The genotype frequency of *CYP1A1m1* in patients with endometriosis (Table II) for the homozygous wild-type (W1/W1) was 67,31% (35/52), 28,84% (15/52) for the heterozygous genotype (W1/m1) and 3,85% (2/52) for the mutant genotype (m1/m1). The genotype frequencies of the *CYP1A1* gene in patients in the control group for W1/W1 was 85,71% (36/42), the heterozygous genotype (W1/m1) was 14,29% (06/42) and 0,0% (0/42) for the mutant homozygous (m1/m1). The frequencies of polymorphic genotypes W1/m1 and m1/m1 were higher in patients with endometriosis compared to controls. The difference insignificant,  $p=0,087$ .

Table II - Distribution of genotype frequencies for the gene YP1A1m1 comparing endometriosis and control group

Genotype	Endometriosis (n) %	Control (n) %	X <sup>2</sup>	DF	p
W1/W1	(35) 67,31	(36) 85,71	4,862	2	0,087
W1/m1	(15) 28,84	(06) 14,29			
m1/m1	(02) 3,85	00			
Total	(52) 100	(42)100			

Value  $P \leq 0,05$ .

The allele frequencies W1 of the *CYP1A1*m1 gene in patients (Table III) with endometriosis for the homozygous wild allele was 67,30% (70/104) and 32,70% (34/104) for the mutant allele (m1). The frequencies in the control group for the homozygous wild-type (W1) was 85,71% (72/84) and for the m1 allele (mutant) was 14,29% (12/84). The frequencies of mutant alleles (m1) were higher in women with endometriosis compared to control group. The difference is significant,  $p = 0,006$ .

Table III - Distribution of allele frequencies for the gene *CYP1A1*m1 comparing endometriosis and control group

Allele	Endometriosis (n)%	Control (n)%	X <sup>2</sup>	DF	p
W1	(70) 67,30	(72) 85,71			
m1	(34) 32,70	(12) 14,29	8,519	1	0,006
Total	(104) 100	(84) 100			

Value  $P \leq 0,05$ .

The genotype frequencies of *CYP1A1*m1 (Table IV) when compared to the endometriosis type I / II showed for this class of the disease that 68,19% (15/22) of the patients were W1/W1, 31,81% (07/22) were W1 / m1 and 0.0% (0.0 / 22) was genotype m1/m1. For class III / IV patients with genotype W1/W1 were 66,67% (20/30) 26,66% (08/30) for the genotype W1/m1 and 6,67% (02/30) is m1/m1. The frequencies of polymorphic genotypes m1/m1 W1/m1 and are higher in patients with endometriosis according to the class III or IV patients compared to class I / II, thus the difference is not Significant,  $p = 0,452$ .

Table IV - Frequency distribution of genotypes *CYP1a1*m1 comparing gene to types of endometriosis (Class I / Class II / or Class III / Class IV)

Endometriosis Group	Genotype			X <sup>2</sup>	DF	p
	W1/W1(n)%	W1/m1(n)%	m1/m1(n)%			
Class I/II (n=22)	(15)68,19	(07)31,81	00			
Class III/IV (n=30)	(20)66,67	(08) 26,66	(02) 6,67	1,588	2	0,452

Value  $P \leq 0,05$ .

The allelic frequencies of *CYP1A1*m1 (Table V) when compared to the endometriosis type I / II showed that for this class of the disease 68,19% (30/44) of the patients were W1/W1 31,81% (14/44) were W1/m1 and 0.0% (0/44) was genotype m1/m1 frequencies of *CYP1A1*m1 (Table V) when compared to the endometriosis type I / II showed that for this class of the disease 68,19% (30/44) of

the patients were W1/W1 31,81% (14/44) were W1/m1 and 0,0 (0.44) was genotype m1/m1. For class III / IV patients with alleles W1/W1 were 66,67% (40/60), 26,66% (16/60) for W1/m1 and 6,67% (04/60) for m1/m1. The frequencies of polymorphic alleles W1/m1 and m1/m1 are more frequent in patients with endometriosis according to the class III or IV compared to patients class I / II, thus the difference is not significant,  $p = 0,204$ .

Table V – Frequency distribution of alleles comparing gene *CYP1A1m1* to types of endometriosis (Class I/ Class II or Class III / Class IV)

Endometriosis group	Genotype			$X^2$	DF	p
	W1/W1(n)%	W1/m1(n)%	m1/m1(n)%			
Class I/II (n=44)	(30) 68,19	(14) 31,81	00			
Class III/IV (n=60)	(40) 66,67	(16)26,66	(04)6,67	3,176	2	0,204

Value  $P \leq 0,05$ .

The genotype frequencies of polymorphism in *CYP1A1m1* gene from fertile patients (Table VI) for homozygous wild-type (W1/W1) were 79,16% (19/52), for heterozygote genotype (W1/m1) were 16,67% (04/52) and for homozygous mutant (m1/m1) were 4,17% (01/52). The genotype frequencies in infertile patients with endometriosis for the homozygous wild-type (W1/W1) were 55,56% (15/27), 40,74% (11/27) for genotype W1/m1 and 3,70% (01/27) for homozygous mutant m1/m1. The genotype frequencies in patients without endometriosis for homozygous wild-type (W1/W1) were 85,72% (36/42), 14,28% (06/42) for genotype W1/m1 and 0% (0/42) for homozygous mutant (m1/m1). The genotype frequencies among the infertile patients were higher compared to fertile patients. The difference is significant,  $p = 0,05$ .

Table VI - Frequency *CYP1A1m1* gene genotype among cases (endometriosis) (fertile and infertile patients) compared with the control group.

Genotype	Fertile (n)%	Infertile (n)%	Control (n)%	$X^2$	DF	p
W1/W1	(19) 79,16	(15) 55,56	(36) 85,72			
W1/m1	(04) 16,67	(11) 40,74	(06) 14,28	9.306	4	0,05
m1/m1	(01) 4,17	(01) 3,70	(00) 00			
Total	(24) 100	(27) 100	(42) 100			

Value  $p \leq 0,05$ .

In order to reassess the results of this study was done a sensibility test which obtained 70% in patients with endometriosis and specificity value of 37%. The positive predictive value was 36% and the negative predictive value was 42%, thus indicating that the gene *CYP1A1m1* is an important biomarker and it may help studies about pre-disposition to endometriosis.

## DISCUSSION

This study analyzed patients aging from 25 and 35 years with endometriosis. The average age of patients at higher risk of infertility was 30.23 years. These results are in accordance with [15], who reported that the average age at which a diagnosis of endometriosis is established is around 31 years. Also [16] reported that the average age for the diagnosis of endometriosis is 28 years. The analysis of patients without endometriosis (control group) revealed an average age of 37.38 years and this difference is approximately four (04) times higher compared to group patients with endometriosis, whereas the average age of patients with endometriosis and significantly lower 25-30.

The data found in this study revealed significant differences between endometriosis and polymorphism of m1 allele in women with endometriosis, two of them being homozygous mutants compared to controls. Nakata and colleagues [17] analyzed 25 patients with endometriosis and 25 without the disease (control group). The frequency obtained between the two groups indicated no association of the polymorphic allele *CYP1A1m1* with endometriosis. The observed allele frequency was higher in women with endometriosis when confronted to the control group. Two patients with the disease were homozygous for the allele m1, however this difference was not significant. In contrast to in a study of 310 Indian women with endometriosis and 215 controls were analyzed and no association between endometriosis and polymorphisms of the *CYP1A1* gene was found [18].

The study also revealed that the genotypes (m1) were not significant when compared to the different degrees of the disease. There were no differences between patients with class I / II compared to class III / IV. However, the m1 genotype frequencies were more frequent in patients with severe endometriosis. These results also are present in fertile women with endometriosis in the same

degrees. This suggests that this polymorphism may also influence its progression to a severe form.

## CONCLUSION

Our study confirmed the importance of the knowledge about the polymorphic *CYP1A1m1* and its correlation to endometriosis. As a result was found a significant association between endometriosis and the polymorphic alleles of *CYP1A1m1* gene in women with endometriosis. No differences were found between patients in class I / II and class III / IV compared to the polymorphic alleles of the gene *CYP1A1m1*. Regarding this we conclude that the polymorphisms W1/m1 and m1/m1 are more frequent in the group of patients with infertility which are also more severe. The results of this study can contribute to the diagnosis and prognosis of the disease in.

## Acknowledgements

SR de Souza and KKVO Moura acknowledge the contribution of this work for executable rights. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brazil (PUC-GO/PROPE/Mgene). We are grateful to the Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana - FÉTILE and the Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon (PUC-GO), Goiania, Goiás, Brazil, which enabled us to conduct this research and support.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - Abrão MS; Podgaec S; Dias Jr JA. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. *Prat Hosp.* 50:73-77; 2007.
- [2] - Podgaec S; M S Abrão; Dias Jr JALV; Rizzo, R M. de Oliveira, C E Baracat. Endometriose: uma doença inflamatória, com uma componente de resposta imuneTh2. *Hum Reprod.* 22 (5): 1373-9; 2007.
- [3] - Guo SW; Wang, Y. Sources of heterogeneities in estimating the prevalence of endometriosis in infertile and previously fertile women. *Fertil Steril*; 86:1584–1595; 2006.

- [4] - Abrão, MS. Endometriose, uma visão contemporânea. Editora Revinter; 1a edição: 257-35; 2000.
- [5] - Bankowski, BJ. Manual de Ginecologia e Obstetrícia do Johns Hopkins. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [6] - Kistner, RW. Tratado de Ginecologia Segunda Edição, Ediciones Toray , Barcelona , p.830 - 1983.
- [7] - *American Fertility Society* (Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis. *Fertil Steril*; 43:351-2; 1985.
- [8] - Donadio, Nilson. Consenso Brasileiro em Videoendoscopia Ginecológica. São Paulo: Artes Médicas – 2001.
- [9] - Arvanits DA; Goumenou AG; Matalliokis I M; Komantakis EE; Spandidos D A. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*.76:1202-1206; 2001.
- [10] - Kennedy S; Mardon H; Barlow D. Familial endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 12:32-4 - 1995.
- [11] - Wilkinson, J.; Clapper, ML. Detoxification enzymes and chemo prevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine*, 216: 192-200; 1997.
- [12] - Cascorbi, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. *Toxicology Letters*, 162: 16-28, 2006
- [13] - Walker, CL. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference: Cancer Susceptibility Genes and Molecular Carcinogenesis. *Molecular Medicine Today*, 2:364-365, 1996.
- [14] - Carstensen, U; Alexandrie, AK; Hogstedt, B; Rannug, A; Bratt, I; Hagmar, L. B- and T- lymphocyte micronulei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for *CYP1A1* and *GSTT1* (class Mu). *Mutation Research*, 289:187-195, 1993.
- [15] - Moura, MD; Negreiros TP; Nogueira, AA; Ferriani, R Al; Sala, M M; Reis, RM. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. *RBGO* . 21 (2): 85-90, 1999
- [16] - Pritts EA, MD; Taylor RN; PhD, MD. An evidence-based evaluation of endometriosis associated infertility. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 32:653-667; 2003.
- [17] - Nakata, LC; Bertollo, EMC; Dos Santos, I; Oliani, AH; Vaz, DCM; Oliveira, GH; Bertelli ,ECP. *Biomarcadores de Susceptibilidade à Endometriosis*. *RBGO*, V.26, Nº4, 2004.

[18] - Babu, K; Reddy, NG; Deendayal, M; Shivaji, S; GSTM1, GSTT1 and *CYP1A1* detoxification gene polymorphisms and their relationship with advanced stages of endometriosis in South Indian women. *Pharmacogenet Genomics*. 5(3): 167-172; 2005.