



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *RsaI* DO GENE RECEPTOR BETA
ESTRÓGENO ($RE\beta$) EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DA COSTA E SILVA

Goiânia, GO
2010



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *RsaI* DO GENE RECEPTOR BETA
ESTRÓGENO ($RE\beta$) EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DA COSTA E SILVA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura e Co – orientação da Profa. Bárbara Mariotto Bordin, MSc.

Goiânia, GO

2010

S586a Silva, Rita de Cássia Pereira da Costa e.
Análise do polimorfismo *RsaI* do gene receptor beta
estrógeno (RE β) em mulheres com endometriose. – 2010.
92 f.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica
de Goiás, Mestrado em Genética, 2010.

“Orientação: Prof^a. Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira
Moura”.

“Co-orientação: Prof^a. Bárbara Mariotto Bordin, MSc.”.

1. Endometriose. 2. Genética. 3. Receptor beta estrógeno
(RE β). 4. Infertilidade. I. Título.

CDU: 618.14-002(043.3)

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

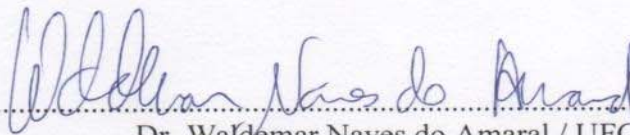
BANCA EXAMINADORA



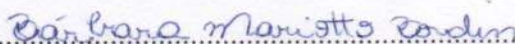
.....
Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura – MGene / PUC Goiás



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



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



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

Goiânia, 30 de junho de 2010

Dedico este trabalho

À Generosidade Divina, que me deu discernimento e sabedoria nas minhas escolhas,

Aos meus pais Jônatas Pereira da Costa e Marina Gomes da Costa, “In memoriam”, exemplos de garra, dignidade, fonte inesgotável de princípios e valores que são constantes em minha vida!

Ao meu esposo Clemar Pereira da Silva e meus filhos Gabriela e Jônathas Levy, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e ininterrupto durante toda minha pós-graduação;

E aos meus irmãos, cunhados (as), e sobrinhos (as) que reclamaram minha ausência em reuniões familiares e mesmo assim, apoiaram a continuidade desta jornada.

Recebam com amor e muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Às **voluntárias**, que confiaram e proporcionaram a execução desta pesquisa, colaborando para o meu crescimento profissional.

A **Prof^a. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura**, pela amizade e pelo acolhimento sempre tão carinhoso, atencioso, oportunidade pelos conhecimentos transmitidos e orientação neste trabalho nos ensinamentos de genética molecular, no aprendizado da pesquisa, e no exercício da ética.

À co-orientadora deste estudo, a **Prof^a. Bárbara Mariotto Bordin MSc.** que não mediu esforços para transmitir seus conhecimentos, co-orientando de forma generosa e incansável nesta jornada.

Aos **professores e Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás** pela oportunidade de aprendizagem e crescimento que me foi transmitida, facilitando o uso da estrutura dos laboratórios na execução dos ensaios, além do incentivo constante através de suas palavras sempre muito valiosas, em especial a **Prof^a. Dra. Daniela Melo e Prof. Dr. Aparecido Cruz.**

Aos **profissionais e amigos do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia HC UFG–GO**, pelo apoio e paciência nestes últimos dois anos onde minhas discussões repetiam em volta deste trabalho, e de onde estive afastada destes amigos no último ano para esta produção.

À **Diretoria do Hospital de Clínicas da UFG**, que valorizou e permitiu a minha dedicação para realização desta dissertação, nas pessoas do **Diretor geral Dr. José Garcia**, e a **Diretora Gestão de Pessoas Enf^a. Alexandrina Maria Nogueira Gerra Adorno** e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos **colegas do Laboratório Replicon** onde passei a maioria do meu tempo durante dois anos, pela disciplina técnica, acompanhamento e discussões sadias, e também pela companhia durante o horário do almoço e no cafezinho.

Aos **amigos, Constanza, Carol, Suelene, Ariane, Emília, Jean, e Rita (xará)**, que sempre me acolheram com um sorriso e companheirismo, ao Circoncisto pela generosidade e contribuição técnica profissional.

À **Dra. Iasmim Ribeiro da Costa**, uma grande conquista nesta caminhada, minha amiga meiga e generosa que compartilhamos grandes momentos de crescimento pessoal e profissional e a certeza que alcançará tudo que almeja você merece!

Aos **fraternos colegas de longas jornadas do Laboratório Saluti**, nas pessoas da **Dra. Marlene Martins e Dr. Wilmon Cunha**, pelo amparo amigo nos momentos difíceis e apoio financeiro que facilitou o meu ingresso à pós-graduação.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao “Prof. Dr. Gilberto de Oliveira, “In memorian”, que antes de partir me orientou nos caminhos da Genética - Doutor: Minha conquista também é sua, meu muito obrigado onde quer que você esteja!”.

Ao Dr. Mário Approbato, que foi generoso ao dispor minhas horas de trabalho á realização desta pesquisa.

À Josefa Ramos de Sousa Costa, pelo companheirismo fraterno e bom humor nesta jornada, onde em minha ausência, exerceu minhas funções nos afazeres do meu lar tornando mais leve meu caminhar.

Muito Obrigada!

“Sinto-me nascido a cada momento para a eterna novidade do mundo!”
(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	viii
	LISTA DE TABELAS.....	x
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
	RESUMO.....	xv
	ABSTRACT.....	xvi
	INTRODUÇÃO.....	17
1	O Endométrio.....	17
2	O Ciclo Menstrual.....	18
2.1	A Correlação entre o Ciclo Menstrual e Ovulatório.....	18
3	Endometriose.....	20
3.1	Definição.....	20
3.2	Histórico.....	20
3.3	Epidemiologia.....	21
3.3.1	Idade.....	22
3.3.2	Raça.....	22
3.3.3	Avaliação Clínica.....	23
3.3.4	Fumo.....	24
3.3.5	Atividade Física.....	24
3.3.6	História Familiar.....	24
3.3.4	Etiopatogenia da Endometriose.....	25
4	Endometriose e Diagnóstico.....	27
4.1	Diagnóstico Clínico.....	27

1.4.2	Visualização Cirúrgica das Lesões.....	28
1.4.3	Biópsia e Histopatologia.....	30
1.4.4	Marcadores Bioquímicos – Diagnóstico Laboratorial.....	30
1.5	Endometriose e Infertilidade.....	31
1.5.1	Disfunção Ovariana.....	32
1.5.2	Distúrbios de Implantação.....	34
1.5.3	Fatores Imunológicos.....	35
1.5.4	Fatores Genéticos e Endometriose.....	36
1.5.5	Proteína p53.....	39
1.6	Receptores Celulares.....	41
1.6.1	Sinalização Celular.....	41
1.6.2	Receptores Nucleares.....	42
1.6.2.1	O Receptor de Estrógeno (RE).....	45
1.6.2.2	Gene Receptor De Estrógeno (RE).....	48
2.	OBJETIVOS.....	51
2.1	Objetivo Geral.....	51
2.2	Objetivos Específicos.....	51
3.	JUSTIFICATIVA.....	52
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1	Casuística.....	53
4.2	Metodologia - Análise Molecular	53
4.2.1	Extração do DNA	53

4.2.2	Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	54
4.3	Análise Estatística	58
5.	RESULTADOS	60
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
	ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Detalhamento do útero e seus anexos. Fonte: Netter, 1988. Página 17
- Figura 2:** Corte histológico de 20 μ m da parede uterina demonstrando a constituição da parede. Fonte: UNIFESP Ensino, 2008. Página 18
- Figura 3:** Demonstra a correlação do sistema neuroendócrino e menstruação. Fonte: Tindall, 1987. Página 19
- Figura 4:** Desenho ilustrativo dos possíveis locais de incidência da endometriose. Fonte: Elkis, 2009. Página 26
- Figura 5:** Lesões enrugadas pretas foram descritas uma mistura difusa de fibrose, como "clássico" e "típico". Fonte: Ribeiro Júnior, 2009. Página 29
- Figura 6:** Endometrioma ovariano. Sangramento "achocolatado". Fonte: Ribeiro Júnior, 2009. Página 33
- Figura 7:** Desenho esquemático da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína p53. Fonte: Ribeiro Júnior, 2009. Página 40
- Figura 8:** Representando o esquema de sinalização por moléculas secretadas e por moléculas ligadas à membrana. Demonstrando a molécula sinalizadora e seu receptor. Fonte: Alberts, 2003. Página 42
- Figura 9:** Representação esquemática da filogenia dos receptores nucleares com 6 subfamílias e os vários grupos e genes individuais. Demonstrando os receptores de estrogênio na subfamília 3A (NR 3A). Fonte: Heuvel, 2009. Página 43
- Figura 10:** Principais domínios funcionais de receptores de esteróides. Um Domínio aminoterminal (NH₂), domínio de dimerização e ligação ao DNA (DBD), dobradiça do LBD em relação ao DBD (Hinge), domínio de ligação ao ligante (LBD). Fonte: Barra *et al.*, 2004. Página 43

- Figura 11:** Esquema da Teoria das duas células, demonstrando a função das gonadotrofinas no eixo hipófise-hipotálamo-célula na síntese de estrogênios pela aromatização de androgênios. Fonte: Franco, 2009. Página 47
- Figura 12:** Esquema do Cromossoma 14 loco 2 (q23-24). Demonstrando em vermelho o loco 2 onde situa o gene RE β . Fonte: UCSC Genome Browser, 2009. Página 48
- Figura 13:** Organização Genômica do gene RE beta humano, proteína e domínios funcionais. Gene: éxons são indicados com caixas e íntrons com linhas. Os números acima de cada caixa indicam o tamanho dos éxons (bp); os números abaixo de cada linha indicam o tamanho respectivo dos íntrons (bp). As linhas entre os gene e pontos de proteínas são os domínios das junções protéicas. Proteínas: O número indica o tamanho total do aminoácido da proteína. Na área pintada mostra a divergência das regiões C-terminal entre as isoformas. Descrição: O gene ER beta consiste de 8 éxons. A abertura de leitura da região codificada é 1,593 bp. Fonte: Gustafsson , 1999. Página 48
- Figura 14:** Estrutura dos Domínios funcionais e descrição dos Polimorfismos do gene humano receptor β . Éxons codificados e indicados dentro das caixas pela letra E. TAF, função de atividade transcricional; UTR, região não codificada. Fonte: Gennari *et al.*, 2005. Página 50
- Figura 15:** Foto do gel de agarose a 2% corado com Brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a cada primer utilizado na análise do polimorfismo RsaI do gene ER β . Coluna 1: Controle positivo e Ausência das variantes; Coluna 2: Presença das variantes A ou G. 3: Controle negativo e presença das variantes A ou G. L: Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).Fonte: Silva *et al.*, 2009. Página 55
- Figura 16:** Demonstra os alelos Arginina e Prolina do gene p53 e seus pb. Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen). Fonte: Silva *et al.*, 2009. Página 59

LISTA DE TABELAS

- Tabela I** Seqüência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos para o gene RE β .
Página 55
- Tabela II** Protocolo para amplificação do polimorfismo *RsaI* do gene RE β (*RsaI* variante A, *RsaI* variante G). Página 55
- Tabela III** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* do polimorfismo *RsaI* do gene RE β para as variantes A e G. Página 56
- Tabela IV** Seqüência dos primers analisados nas amostras de DNA em pares de bases.
Página 56
- Tabela V** Protocolo para amplificação do polimorfismo do gene *p53* (no códon 72) (*Prolina e Arginina*). Página 57
- Tabela VI** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* (*Arginina*).
Página 57
- Tabela VII** Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* (*Prolina*).
Página 58
- Tabela VIII** Idade média das pacientes com endometriose e controles (em anos).
Página 60
- Tabela IX** Distribuição da freqüência genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene RE β das pacientes com diagnóstico de endometriose e pacientes controles. Página 60

- Tabela X** Distribuição da frequência genotípica nas amostras de pacientes com diagnóstico de endometriose em subgrupos de pacientes férteis e inférteis e controles. Página 61
- Tabela XI** Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose e subgrupos de férteis e inférteis em seus graus de classificação de vários estágios, de acordo com o número e a localização das lesões segundo *American Fertility Societ*. Página 62
- Tabela XII** Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de fumar. Página 62
- Tabela XIII** Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de ingerir bebida alcoólica (bebem). Página 63
- Tabela XIV** Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de usar anticoncepcionais. Página 64
- Tabela XV** Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de praticar atividades físicas. Página 64
- Tabela XVI** Frequência genotípica do gene *p53* em pacientes com endometriose e controles. Página 65
- Tabela XVII** Frequência genotípica do gene *p53* nas pacientes dos grupos com endometriose e controle, em relação ao polimorfismo *RsaI* do gene *REβ*. Página 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A - Adenina

a.C.- Antes de Cristo

ACHO - Anticoncepcional hormonal oral

AF1 – Ativação da função 1

AFP - alfafetoproteína

(A→G) – Transição de uma Adenina para uma Guanina

ALU - Pequena seqüência repetida de DNA (enzima de restrição)

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutado

BRCA – Câncer de mama (*Breast cancer*)

B2MG - beta-2 microglobulina

c-Abl – Proteína oncogênica (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (ABL1), também *p150*)

c AMP - *Cyclic adenosine monophosphate*

CA 15-3 - marcador tumoral relacionado ao câncer de mama

CA 19/9 - marcador tumoral relacionado ao grupo sanguíneo Lewis

CA 125 – Antígeno cancerígeno 125 ou antígeno carboidrato 125

CCC - Citosina, citosina, citosina

CEA – Antígeno cárcino embrionário

CGC - Citosina, guanina, citosina

CoA - Coenzima A

COMT - Catechol-O-methyltransferase

CP1A1 - *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*

CRE - Elemento Regulador da cAMP

C-terminal - Carboxi-terminal

CYPs - Citocromo p450

d.C.- Depois de Cristo

14q - Braço longo do cromossomo 14

DBD - Domínio de dimerização e ligação ao DNA (*DNA-binding domain*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

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

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FEBRASGO – Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

G - Guanina

GADD-45 – Gene que induz a correção de lesão do DNA (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*)

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina (*Gonadotrofins Release Hormons*)

GSTM1 - Glutathione S-transferase M1

GSTs - Glutathione S-transferase

GSTP1 - Glutathione S-transferase P

GSTT1 - Glutathione S-transferase teta 1(θ 1)

HAT - Histona acetil-transferase

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

HDM2 - Gene Humano *double minute 2*

HMG CoA - *hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*

17-beta HSD – Enzima 17- beta-Hidroxiesteroide desidrogenase (*17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase*)

IFN - interferon

IL - Interleucinas

Kb – Kilobase

KI 67 - Antigen KI-67

LBD – Domínio de ligação ao ligante (*Ligand-binding domain*)

LH - Hormônio Luteinizante

LINFÓCITOS T - Linfócitos originados do Timo

LINFÓCITOS B - Linfócitos da célula B

LUF - Síndrome da luteinização do folículo não-roto (*Luteal unruptured follicle syndrome*)

Mspl – Polimorfismo de restrição (*CYP11A1m1*)

NAT- N-acetyltransferase

NR – *Nuclears Receptors*

N-terminal - Amino-terminal

OT- Ocitocina

OTR - Ocitocina receptor

P53 - Proteína p53

p53 - Gene p53

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

% - Porcentagem

PRO/72 – Alelo prolina no códon 72

PR – Receptor de Progesterona

PROGINS - Gene do receptor de progesterona

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

P21 - proteína p21

RE - Receptor de estrógenos/ Receptor de estrogênios

RNAs - Ácidos ribonucléicos

SBE - Sociedade Brasileira de Endometriose

SHHO - Sistema neuroendócrino, hipotálamo, hipófise e ovário

SNPs - Polimorfismo de nucleotídeos únicos

STK15 - *serine/threonine kinase-15*

SV- 40 - *Simian vacuolating virus 40* or ***Simian virus 40***

Th (1 ou 2) - *T helper cells*

TNF - Fator de necrose tumoral

Tob-1 – Proteína codificada pelo gene TOB1

Waf1- Inibidora de cinases dependentes de ciclinas

χ^2 – Qui-Quadrado

RESUMO

A endometriose é definida pelo aparecimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticos aos da cavidade uterina em outras localizações, que não o endométrio. E esses focos de tecido geralmente são funcionantes e sensíveis à ação de hormônios apresentando um forte componente genético correlacionando a doença com diversos polimorfismos. Incide principalmente em mulheres em idade reprodutiva. Está presente em 10% na população geral e com infertilidade em 30% a 40% dos casos. O grau do comprometimento da endometriose baseia-se num sistema de pontos proposta pela *American Society for Reproductive Medicine* (1978), com base nos achados de laparoscopia. A ação estrogênica é mediada por receptores intracelulares, que com a ligação dos ligantes são translocados para o núcleo onde ativam a transcrição gênica e o RE β é uma das isoformas destes receptores. O gene do RE β foi mapeado e localizado no braço longo do cromossomo 14 no loco 2 entre os sublocos 22 e 24 (14q22-24) e o polimorfismo consiste em uma transição silenciosa G1082A no domínio de ligação do éxon 5. A intenção deste estudo foi determinar a frequência do polimorfismo *RsaI* do gene RE β , em dois grupos de pacientes com endometriose e sem sintomas da doença. O estudo incluiu 54 amostras de sangue periférico de mulheres com endometriose proveniente de um centro de referência em videolaparoscopia e infertilidade de Goiânia (FÉRTILE) e 46 amostras de sangue periférico de mulheres sem clínica de endometriose chamado de grupo controle. Posteriormente o grupo com endometriose foi subdividido em dois grupos férteis (n= 25) e inférteis (n= 27). O polimorfismo *RsaI* do gene RE β (AA, AG, GG) e do gene *p53* no códon 72 foi avaliado por PCR. A frequência do genótipo heterozigoto AG foi 9 vezes maior nas pacientes com endometriose (59,3%) do que no grupo controle (6,5%). As pacientes férteis (68%) apresentaram uma frequência AG de 10,5 vezes maior que no grupo controle (6,5%) e as inférteis (55,6%) 8,5 vezes maior que no grupo controle. Dos hábitos sociais como o fumo, álcool, anticoncepcionais e atividade física não foi encontrado uma associação significativa. Das pacientes com genótipos ArgPro/ProPro (51,5%) do polimorfismo do gene *p53* a frequência AG foi 8,6 vezes maior do que no grupo controle (6%). Conclui-se que, a frequência AG do polimorfismo *RsaI* do gene RE β está associada a presença da endometriose.

Palavras chave: endometriose, receptores estrógenos, e infertilidade.

ABSTRACT

Endometriosis is defined by the appearance of foci of endometrial tissue with glandular features and / or stromal identical to the uterine cavity at locations other than the endometrium. And these foci of tissue are usually functioning and sensitive to the action of hormones showing a strong genetic component to disease correlated with several polymorphisms. It focuses primarily on women of reproductive age. Is present in 10% of general population and infertility in 30% to 40% of cases. The degree of involvement of endometriosis is based on a points system proposed by the American Society for Reproductive Medicine (1978), based on the findings of laparoscopy. The action of estrogen is mediated by intracellular receptors that, with the binding of ligands are translocated to the nucleus where it activates gene transcription and *REβ* is one of the isoforms of these receptors. The *REβ* gene was mapped and located on the long arm of chromosome 14 in the loco 2 among subloco 23:24 (14q22-24) and the polymorphism consists of a silent G1082A transition in the binding domain of exon 5. The intent of this study was to determine the frequency of the *RsaI* polymorphism of the gene *REβ* in two groups of patients with endometriosis and without symptoms. The study included 54 samples of peripheral blood of women with endometriosis from a referral center in laparoscopy and infertility in the city of Goiania (FÉRTILE) and 46 peripheral blood samples from women without endometriosis clinic called the control group. Later the group with endometriosis were divided into two groups fertile (n = 25) and infertile (n = 27). The *RsaI* polymorphism of the gene *REβ* (AA, AG, GG) and the gene *p53* in codon 72 was assessed using PCR. The frequency of heterozigous genotype AG was nine times higher in patients with endometriosis (59.3%) than in the control group (6.5%). The fertile patients (68%) had a frequency of AG 10.5 times higher than in the control group (6.5%) and infertile (55.6%) 8.5 times higher than in the control group. Social habits like smoking, alcohol, contraceptives and physical activity was not found a significant association. Of the patients with genotypes ArgPro/ProPro (51.5%) of the polimorphism of *p53* gene the AG frequency was 8.6 times higher than in the control group (6%). We conclude that the AG frequency of the *RsaI* polymorphism of the gene *REβ* is associated with the presence of endometriosis.

Keywords: endometriosis, estrogen receptors, and infertility.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Endométrio

O útero é constituído pelas camadas: perimétrio, miométrio e endométrio, sendo o endométrio a mucosa que reveste a cavidade uterina. Esta mucosa cresce durante o ciclo ovulatório e desprende-se ao final (caso não ocorra gravidez), e é eliminada no ciclo menstrual (Lecke *et al.*, 2006) (Figura 1).

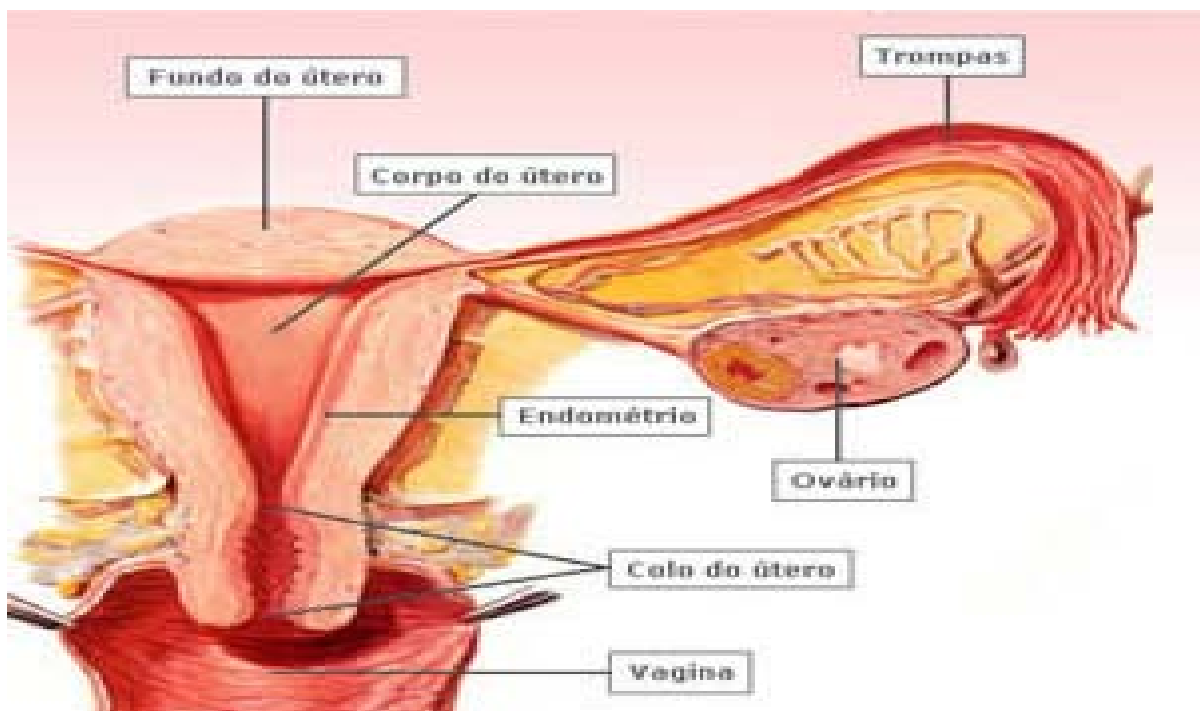


Figura 1 - Detalhamento do útero e seus anexos. Fonte: Netter, 1988.

O endométrio é constituído por epitélio e lamina própria, contendo glândulas tubulosas e simples que podem ramificar até o miométrio (Figura 2). Este epitélio além de revestir e proteger o útero, secreta um muco de constituição glicoprotéica. O tecido da lamina própria é rico em células e apresenta grande quantidade de material intercelular amorfo.

Os hormônios ovarianos produzidos pelo estímulo da hipófise anterior submetem o endométrio a mudanças estruturais cíclicas que constituem o ciclo menstrual (Lecke *et al.*, 2006).



Figura 2 - Corte histológico de 20 μ m da parede uterina demonstrando a constituição da parede. Fonte: UNIFESP Ensino, 2008.

1.2 O Ciclo Menstrual

O conjunto de modificações cíclicas que ocorrem no corpo da mulher, de caráter periódico e temporário, que se repete cada mês, entre a menarca e a menopausa, se convencionou chamar de ciclo menstrual (Moreira *et al.*, 2002).

Lima (1975) relata que o episódio da menstruação dentro do ciclo menstrual, representado pelo sangramento genital, configura o epílogo de uma série de eventos endócrinos dinâmicos e independentes do sistema hipotálamo-hipófise-ovariano (SHHO) (Moreira *et al.*, 2002).

1.2.1 A Correlação entre o Ciclo Menstrual e Ovulatório

A neuroendocrinologia é o estudo da produção e liberação de hormônios por células nervosas - neurônios, e a interação destes com vários órgãos e tecidos alvo, sendo a ovulação o resultado final dessas interações hormonais, gonadais e extra-gonadais, que se iniciam na menarca e continuam até a menopausa (Ganong *et al.*, 2000).

O sistema neuroendócrino composto de: hipotálamo, hipófise e ovário (SHHO) tem características básicas que o identificam, como o complexo sistema nervoso, controle retroativo ovariano e a unidade folicular e corpo lúteo (Moreira *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 1990) (Figura 3). Para que aconteça essa interação entre o sistema neurológico e endócrino é necessário haver a integridade anatômica e funcional do eixo neuroendócrino, e influenciado pelo córtex cerebral e o sistema límbico (Ganong *et al.*, 2000).

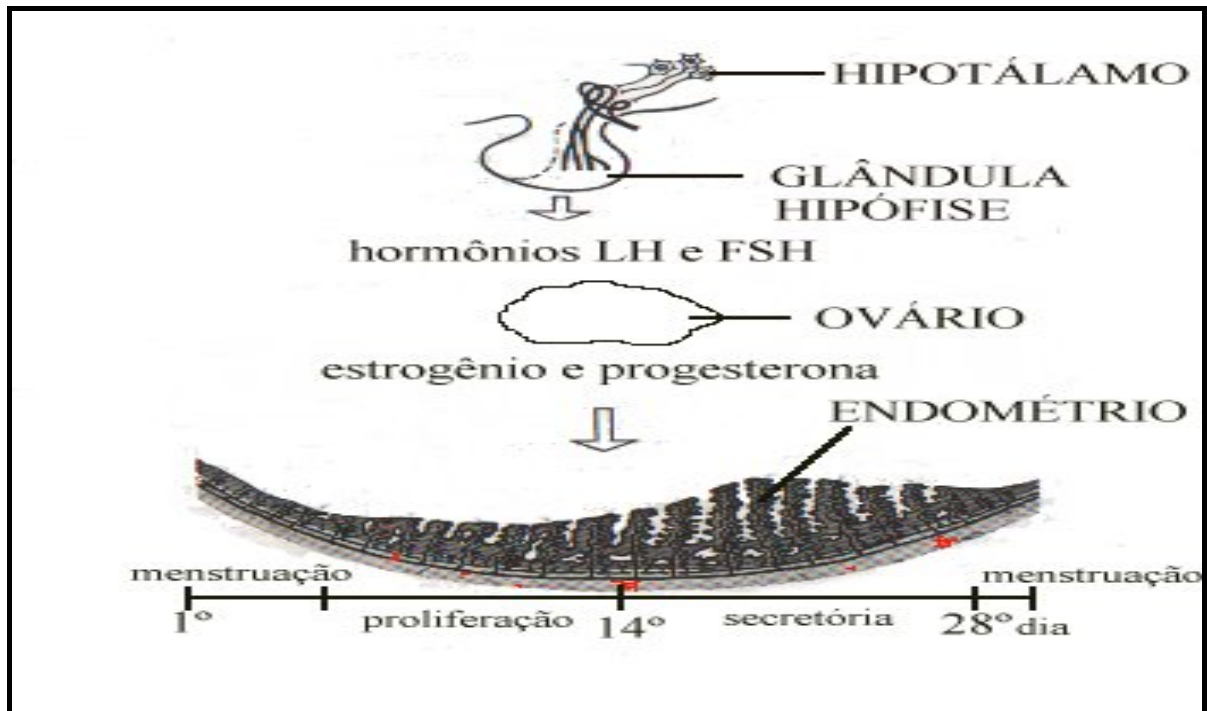


Figura 3 - Demonstra a correlação do sistema neuroendócrino e menstruação. Fonte: Tindall , 1987.

A hipófise era considerada a glândula principal nesse comando neuroendócrino, no entanto, estudos apontaram o hipotálamo como a glândula principal, influenciado pelo sistema nervoso central e periférico. Atualmente acredita-se que os eventos que regulam o ciclo menstrual são produzidos pelos esteróides sexuais sintetizados pelo próprio folículo destinado a ovular naquele ciclo (Ganong *et al.*, 2000).

O ciclo menstrual da mulher dura em média 28 dias, embora ocorram aumentos intervalares nos dois extremos da vida reprodutiva e que correspondem a ciclos endócrinos não ovulatórios, ocorrência que é consequência de irregularidades no padrão secretor cíclico das gonadotrofinas e do estradiol (Moore *et al.*, 2001).

Didaticamente, o ciclo menstrual é dividido em três fases: fase folicular (foliculogênese), fase ovulatória e fase lútea. A glândula hipófise que fica dentro do crânio é responsável pela secreção de dois importantes hormônios, o luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH). Essas gonadotrofinas hipofisárias não só regulam o ciclo ovariano, mas, sobretudo o estradiol (Moreira *et al.*, 2002).

Na fase folicular, FSH irá desenvolver o folículo e o pico do LH irá desencadear a ovulação normalmente por volta do 14º dia do ciclo. O folículo no ovário produz o estrogênio que faz com que o endométrio prolifere, ou seja, aumente sua espessura. Mas a partir da ovulação o ovário passa a secretar também a progesterona e ela faz o endométrio "inchar" e

este inchaço, que é o edema do estroma caso não ocorra a fecundação do óvulo, as células do estroma tornam-se hipertrofiadas desencadeando a descamação endometrial e o corrimento menstrual. Na fase ovariana a função ovariana é dupla: gametogênica e endócrina; influenciando toda parte endocrinológica da mulher; já que a função endócrina precede a menarca de forma indeterminada, essa função hormonal é responsável pelo desenvolvimento físico e dos caracteres sexuais secundários (Moreira *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001).

Na fase lútea, com a hiperplasia das células da granulosa a partir da ovulação juntamente com as células tecaais, elas passam a ter funções endócrinas, com síntese esteroidal, constituindo o corpo lúteo. Estas células têm papel importante na aromatização dos androgênios em estrogênios que relataremos no capítulo de endometriose (Moreira *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001).

1.3 Endometriose

1.3.1 Definição

Entre inúmeras definições de endometriose, a clássica de Giordano (1998), define como o aparecimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticos aos da cavidade uterina em outras localizações que não o endométrio, caracteriza a doença. Esses focos de tecido geralmente são funcionantes e sensíveis à ação de hormônios.

1.3.2 Histórico

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

Marques *et al.* (2005) relata em seu estudo que o aspecto histórico da endometriose é bastante prejudicado, por ter sido negligenciado por muitos anos, entretanto um estudo publicado por Knapp (1999), demonstrou que as primeiras descrições da patologia se deram há cerca de 300 anos na Europa, mais precisamente em 1690, pelo médico alemão Daniel Shroen, através do livro “*Disputativo Inauguralis Medica de Ulceribus Ulceri*”. Shroen descreve o que chama de “inflamações” que acometiam mulheres em maturidade sexual, que se distribuíam inicialmente em peritônio e bexiga, intestinos e ligamento largo, vindo a formar

aderências. Ainda segundo Knapp, outros médicos no século XVII fizeram relatos semelhantes de “úlceras peritoneais” que levavam a uma sintomatologia bastante específica, com dor pélvica e sangramentos, embora ainda não percebessem o caráter cíclico do sangramento dessas úlceras e nem mesmo a origem endometrial das mesmas (Marques *et al.*, 2005).

Tailford (1765) teria sido o primeiro a enfatizar o comprometimento ovariano na endometriose e Hochtin (1779) que relatou a importância da dor pélvica no quadro clínico da doença (Marques *et al.*, 2005).

A primeira descrição patológica de um caso de endometriose quando deparou com a presença de tecido semelhante ao endométrio, ectópico, em peças de necropsia teria sido de Carl Von Rokitansky (1860) d.C., na Alemanha, segundo a maioria dos estudos (Ribeiro *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 1998).

Atualmente a teoria de Sampson (1927) é a mais divulgada, onde após outros estudos sobre a doença descreveu a endometriose da forma como é conhecida e sugeriu a menstruação retrógrada como provável etiologia após observar sangue saindo pelas tubas uterinas e no lúmen das trompas de mulheres operadas durante a menstruação (Abrão, 2000).

1.3.3 Epidemiologia

Segundo Yánez (2007), a endometriose é um acometimento cujo diagnóstico só pode realizar-se mediante a observação direta das lesões de maneira intencionada por laparoscopia ou como achado transcirúrgico de algum procedimento com outro fim. Devido a isto, a estatística tem uma dificuldade em representar de uma forma verdadeira este acometimento.

Estudos (Velebil *et al.*, 1995) demonstram que, entre as cinco causas mais frequentes de acometimentos ginecológicos em mulheres norte americanas em idade reprodutiva se destaca a endometriose (terceiro lugar em um estudo com 10.000 mulheres), com uma incidência média anual de 32,4 anos, com intervalo de confiança de 95% de 28.5 – 36.3anos. Citam também outro estudo de coorte, efetuado nos Estados Unidos entre 1988 e 1990, com mais de cinco milhões de casos, em 11,2% o diagnóstico primário foi de endometriose e estudo prévio em 1980, relatou que 6,9% das hospitalizações por problemas geniturinários se deve a endometriose (Yánez, 2007). Quanto ao cálculo da incidência (percentual de novos casos que são determinados em uma população hígida em determinada unidade de tempo) e prevalência (percentual de pessoas em uma população, em um determinado tempo, acometidas pela doença) são necessários dados consistentes sobre o diagnóstico desta patologia (Abrão, 2000).

No caso específico da endometriose esses dados são especialmente difíceis de serem obtidos, já que o diagnóstico definitivo desta afecção depende de um exame histológico o que requer a realização de procedimentos invasivos. Estima-se, baseado na maioria dos estudos, que a endometriose esteja presente em pelo menos 10% a 15% da população geral e que nos grupos de pacientes com infertilidade ou com dor pélvica crônica possa chegar a 50% (Abrão, 2000). A epidemiologia da incidência de endometriose em mulheres com infertilidade gira em torno de 6% a 58% contra apenas 2% a 5% nas mulheres da população em geral (Nisolle, 2008), entretanto, Donnez (2002) relata que a incidência de infertilidade em mulheres com endometriose varia em torno de 30% a 50%.

Segundo a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) (2007), o aumento da prevalência da endometriose se deve à melhora dos recursos diagnósticos, especialmente pela evolução da vídeo-endoscopia. Sem desconsiderar que é uma patologia contemporânea, onde há mais menstruações em mulheres com menos filhos, menstruações mais precoces e gestações tardias.

1.3.3.1 Idade

Geralmente a idade não guarda nenhuma relação com a gravidade da endometriose, há este consenso entre os pesquisadores (Vercellini, 1996). Os estrogênios têm importância no desenvolvimento dessa doença, assim fica claro perceber que o período reprodutivo da mulher é de particular interesse. Moen *et al.* (1997) estimaram que 2% das mulheres entre 40 e 42 anos apresentavam esta patologia, demonstrando que há a incidência também fora da idade reprodutiva já que, a doença pode ser sintomática anos antes do diagnóstico.

Estudo feito no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) entre 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 5 anos. Observou-se a patologia em mulheres variando de 12 a 80 anos, com uma idade média de diagnóstico em torno de 28 anos de idade.

Ressalta-se que nos Estados Unidos o aparecimento da doença é de 11,7 anos antes do diagnóstico (Marques *et al.*, 2005).

1.3.3.2 Raça

Considerando a literatura em estudo, há uma controvérsia quanto ao parâmetro etnia. Existem autores como Kirshon *et al.* (1989); Houston *et al.* (1989) que afirmaram não perceber diferença na incidência entre as diversas raças.

Por outro lado, Chatman *et al.* (1976) defende a prevalência da doença na raça negra e Miyazawa *et al.*, (1976) destacou a raça amarela como a predominante.

Woodworth *et al.* nos Estados Unidos (1995), chama a atenção para uma outra face dessa discussão. O estudo verificou que, as mulheres de cabelos ruivos naturais tem a maior possibilidade de desenvolverem fatores genéticos que levem a endometriose, mostrando que das 143 mulheres selecionadas para o estudo, sendo 12 delas ruivas naturais, variando entre 23 a 41 anos de idade, observou-se que 10 das 12 ruivas, 83% (10/12) tinham endometriose, comparadas com as não ruivas, 41% (55/131).

1.3.3.3 Avaliação Clínica

Dados clínicos mostram que os ciclos ovulatórios são as principais causas de desenvolvimento, persistência e recorrência da endometriose (Olive, 1993).

Os sintomas da patologia se iniciam com a menarca e mantém-se até a menopausa. Depois, a multiparidade está associada à redução do risco de endometriose. Por último, a utilização de medicações que causam anovulação (análogo do GnRH – hormônios gonadotróficos, contraceptivos orais ou progestágenos) reduzem as sintomatologias álgicas da paciente (Missmer, 2004).

Sobre a multiparidade, a mulher a qual passou por períodos de proteção da ação estrogênica, e por ação da progesterona na gravidez, podemos dizer que tem uma incidência menor de endometriose do que uma nulípara. Evidenciaria um equilíbrio estroprogestacional, assim manteria a incidência dessa patologia em torno de 3 a 4% nessas mulheres (Marques, 2005; Parazzini *et al.*, 1989).

A patologia pode ocorrer devido a anormalidades anatômicas ou bioquímicas, por exemplo: pacientes com obstrução mecânica do fluxo menstrual apresentam maior incidência de endometriose devido ao fluxo retrógrado via tubas uterinas. Entretanto, a doença pode advir de situações independentes de fatores mecânicos, como nos casos onde a endometriose é secundária, como a exposição intra-útero do feto ao dietilbestrol, que é um teratôgeno químico (Rock *et al.*, 1982).

Na avaliação da esterilidade, estima-se que em 30% a 50% das situações exista correlação entre esterilidade e endometriose, porém sem uma explicação bem estabelecida.

São necessárias, quando se avalia esta relação, as mulheres assintomáticas, serem usuárias de contraceptivos ou mesmo não possuir vida sexual (Ribeiro Júnior *et al.*, 2009).

1.3.3.4 Fumo

Estudos de Cramer *et al.* (1986) onde mulheres que iniciaram o hábito do tabagismo antes dos dezessete anos, fumando vinte cigarros por dia, apresentam um risco significativamente menor de apresentar endometriose quando comparadas com as não fumantes.

Observa-se diante deste cenário uma controvérsia importante sobre esta análise; contudo o próprio Cramer *et al.* (1986) conclui em seu trabalho que a mulher que fuma mais de vinte cigarros por dia tem seu nível sérico de estrogênios diminuídos e, portanto estaria protegida contra a endometriose.

Por outro lado, Parazzini *et al.* (1989) em suas pesquisas, não encontrou diferença entre fumantes e não fumantes quanto a incidência de endometriose ovariana.

1.3.3.5 Atividade Física

No manual de orientação da Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO, 2007), recomenda-se a prática desta atividade como uma das formas de tratamento da dismenorréia presente na endometriose.

Seria um benefício adicional, na medida em que melhora a imunidade das pacientes que praticam atividade física de forma regular (Cramer *et al.*, 1986). Porém leva-se em consideração que esse efeito protetor depende da época de início e da frequência, para reduzir os níveis de estrogênio circulante nas praticantes.

1.3.3.6 História Familiar

As limitações diagnósticas dificultam a pesquisa nos antecedentes familiares da mulher que questiona sobre sua predisposição á endometriose, vide o procedimento invasivo para tanto (Marques *et al.*, 2005).

Bischoff e Simpson (2004), Moen (1993), relatam em seus trabalhos que a presença da doença em parentes de primeiro e segundo grau, aumenta a incidência em algumas pacientes de 5% a 7%.

Moen *et al.* (1995), mostraram em um trabalho com 515 pacientes que a tendência de desenvolver endometriose é muito maior em pacientes com história familiar. Além disso, o estudo mostra o caso das oito irmãs monozigóticas das quais seis tiveram endometriose documentada.

No trabalho de Ranney (1971), foram realizadas entrevistas com 350 pacientes operadas devido a endometriose, mostrando cerca de 22% delas tinha história de endometriose em familiares. Kennedy *et al.*, (1995) observaram num grupo de 230 pacientes com endometriose, 19 casos de mãe e filha portadoras, 16 pares de irmãs e um caso de irmãs gêmeas portadoras. O que ainda necessita de estudos profundos é esclarecer se os resultados acima citados são devidos aos hábitos de vida semelhantes ou fatores genéticos. Embora não se tenha encontrado uma interação mendeliana clara, a maioria dos pesquisadores acredita que o componente familiar seja de origem poligênica e multifatorial (Bischoff *et al.*, 2000).

Missmer *et al.*(2004) e Bischoff *et al.*(2004) relatam em seus estudos que, a endometriose pode ser hereditária de forma poligênica, sendo sete vezes mais comum em pacientes com história familiar da doença.

Fica implícita a necessidade de mais estudos epidemiológicos que possam elucidar essas dúvidas, dentre as muitas que pairam sobre a endometriose, desde sua fisiopatologia até seu tratamento (Ribeiro Júnior *et al.*, 2009).

1.3.4 Etiopatogenia da Endometriose

A endometriose é uma doença enigmática que gera muitas incertezas quanto a sua etiologia na medida em que existem diferentes teorias, embora nenhuma delas permita explicar todos os casos e todas as localizações (Halme *et al.*, 1984) (Figura 4).

As teorias propostas para o surgimento da endometriose segundo Yáñez (2007) são:

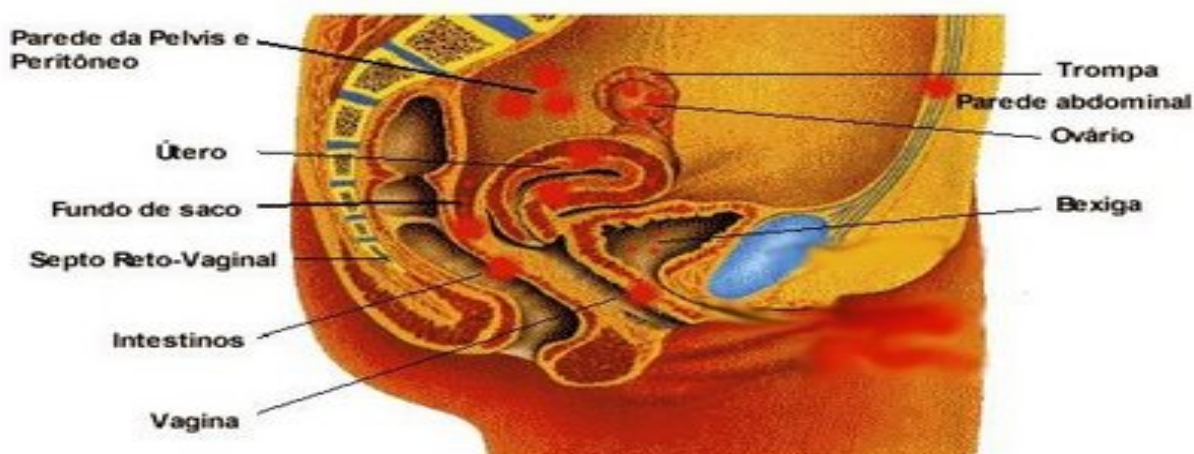
A) Origem Mülleriana:

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

B) Metaplasia Celômica:

Meyer (1919) relatou que o epitélio celômico se transformaria em glândulas e estromas endometriais. Baseia-se no fato de serem tecidos genitais, entre eles o endométrio e o peritônio, oriundo embriologicamente do endotélio celômico, tendo estes a capacidade de se

diferenciarem de elementos müllerianos como o endométrio, a partir de estímulos hormonais exagerados. Acredita-se que essa seja uma provável causa da endometriose do septo retovaginal.



Locais de Endometriose

Figura 4 - Desenho ilustrativo dos possíveis locais de incidência da endometriose. Fonte: Elkis, 2009.

C) Menstruação Retrógrada:

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

D) Disseminação Linfática:

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

E) Disseminação Hematogênica:

Teoria descrita por Sampson (1927) de modo semelhante à teoria da disseminação linfática, o encontro de focos de tecido endometrial viável na parede de vasos sanguíneos,

bem como o fato de que os vasos no período menstrual são mais permeáveis, essa teoria tenta postular o encontro da endometriose em locais distantes, como pulmão, vulva, e baço.

F) Teoria Iatrogênica:

Teoria descrita por Greenhill (1942), é uma teoria não aceita universalmente, em que se encontram focos de endometriose em cicatrizes de cesariana e episiotomias, talvez justificada pelo uso de material “contaminado” por tecido endometrial.

G) Teoria Composta:

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

Segundo o manual de orientação da FEBRASGO (2007), as teorias que predominam são basicamente duas: Menstruação Retrógrada e da metaplasia celômica.

1.4 Endometriose e Diagnóstico

Tem-se 4 meios principais para o diagnóstico da endometriose: Diagnóstico clínico: baseado em história, exame físico e exames laboratoriais não invasivos; Visualização cirúrgica das lesões; Biópsia das lesões com confirmação histológica; Marcadores bioquímicos, como CA-125 (Ulcova, 2001).

1.4.1 Diagnóstico Clínico

Segundo a FEBRASGO e SBE (Sociedade Brasileira de Endometriose) (2007), na endometriose, quanto mais cedo se faz o diagnóstico, melhor. Inclusive para as mulheres que sonham em ter um filho, a precocidade na detecção e tratamento da doença aumenta as chances de gravidez. Outros fatores merecem atenção, como o estadiamento da doença, os órgãos envolvidos, o tipo histológico e as seqüelas cirúrgicas. Há também uma preocupação cada vez maior com a precocidade da doença, que atinge inclusive as adolescentes.

O diagnóstico da endometriose não é tão simples, já que muitas vezes é assintomática e outras vezes se manifesta através de sintomas inespecíficos que não orientam quanto a sua presença e desse modo dificulta o diagnóstico precoce e oportuno e por conseqüência, a terapêutica de forma rápida (Maclaren, 1996). Suspeita-se de endometriose naquelas pacientes

com queixa de infertilidade, dor pélvica cíclica, especialmente exacerbada durante a menstruação (dismenorréia) e a dispareunia profunda (Ribeiro Júnior *et al.*, 2009).

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

a) Dismenorréia: descrita como sintoma clássico da endometriose, é secundária e progressiva (se agrava progressivamente);

b) Dispareunia: sintoma bastante comum, ocorrendo principalmente quando há comprometimento do fundo-de-saco de Douglas e do septo retovaginal e quando existe uma retroversão fixa, do útero, associada;

c) Dor à Defecação: ocorre quando a endometriose se localiza no reto ou em suas proximidades, sendo mais intensa durante a menstruação;

d) Formação tumoral: pode ser a queixa principal da paciente, principalmente no caso de uma lesão da parede abdominal ou do períneo;

e) Dor abdominal: a endometriose geralmente forma aderências entre órgãos pélvicos, produzindo dor crônica no abdome inferior e na pelve, às vezes referida às virilhas, quadris e coxas;

f) Distúrbios menstruais: observam menorragia, hipermenorragia em pacientes com endometriose pélvica, geralmente significando função ovariana alterada devido a comprometimento ovariano bilateral;

g) Queixas urinárias: cerca de 1 a 11% das pacientes com endometriose podem apresentar envolvimento ureteral e da bexiga.

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

h) Infertilidade: há incidência de endometriose em pacientes inférteis de acordo com diversos estudos. Alguns estudos clássicos como Hasson (1976) e de Wheeler (1989) relatam que 6% a 58% das pacientes com infertilidade apresentam endometriose e de Fedelle *et al.* (1992); Thomas (1995) que 30% a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (Giordano, 1998).

1.4.2 Visualização Cirúrgica das Lesões

A endometriose só pode ser confirmada por meio de observação direta através da laparoscopia ou de uma laparotomia, associada à biópsia das áreas de endométrio ectópico (Missmer et al., 2004; Giordano, 1998).

É considerado o padrão ouro para o diagnóstico de endometriose por vários estudos e sociedades de ginecologia no mundo inteiro. Alguns serviços chegam a sugerir a dispensa da confirmação por biópsia, com histopatologia, pela eficácia diagnóstica da visualização cirúrgica (Marques et al., 2005; Missmer et al., 2004).

O aspecto encontrado na avaliação laparoscópica da endometriose peritoneal se dá pelo encontro de lesões com aspectos sugestivos. Existe a lesão considerada típica de endometriose composta de glândulas, estromas e debris endometriais. Na laparoscopia se observa uma lesão negra, azulada ou arroxeadada, pregueada, associada a uma cicatrização em forma de estrela decorrente de sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos (Figura 5) (Júnior *et al.*, 2009; Nissole *et al.*, 1994). O procedimento, entretanto, apresenta algumas desvantagens e problemas técnicos como o custo do procedimento e a acuidade do diagnóstico que depende da experiência e conhecimento do cirurgião ao visualizar uma lesão (Nissole, 2002).

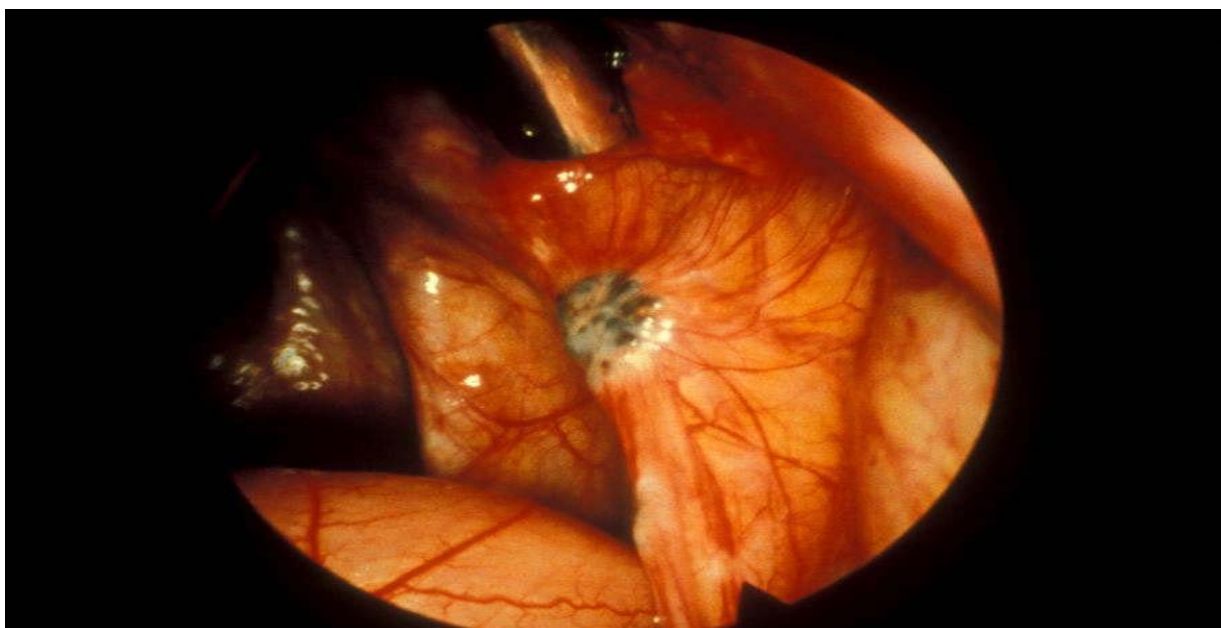


Figura 5 - Lesões enrugadas pretas foram descritas uma mistura difusa de fibrose, como "clássico" e "típico".
Fonte: Ribeiro Júnior *et al.*, 2009.

Quanto a variabilidade de diagnóstico por diferença entre visualização e interpretação pelos cirurgiões, Pardani e Barbieri, em 1998, fizeram o trabalho demonstrando como padrão ouro a cirurgia no diagnóstico da endometriose nos achados visuais ou nos resultados

de biópsia (“*The gold standard for the surgical diagnosis of endometriosis: visual findings or biopsy results*”) (Marques, 2005).

Nesse estudo foi avaliada a variabilidade diagnóstica da endometriose inter cirurgião. O que se percebeu é que entre os três cirurgiões envolvidos no estudo, tivemos uma taxa de confirmação patológica das endometrioses por eles visualizadas de 42% de acerto para o primeiro cirurgião, 65% para o segundo e 76% para o terceiro. Esses valores mostram de modo explícito que essa técnica diagnóstica tem um grau de variação de resultados relativamente alta. Um ponto importante é que, a localização e o volume das lesões de endometriose também podem prejudicar o acerto diagnóstico. Lesões subperitoneais ou profundamente invasivas em fundo de saco de Douglas podem ser de difícil visualização numa laparoscopia padrão. Lesões pequenas ou de apresentação atípica também podem induzir ao erro (Marques, 2005).

1.4.3 Biópsia e Histopatologia

É o método cirúrgico superior para confirmar diagnóstico. Os critérios utilizados para o diagnóstico histológico são na ordem são as glândulas estroma endometriais; epitélio glandular com hemosiderina; tecido *endometrial-like* com hemosiderina.

Um problema que repercute sobre essa técnica é que os critérios diagnósticos podem variar entre os patologistas e não se tem estudos inter-observacionais, como se tem com os cirurgiões (Nisole, 2001).

1.4.4 Marcadores Bioquímicos - Diagnóstico Laboratorial

A primeira vez que relataram sobre um marcador bioquímico, CA 125, que estaria aumentado no soro de mulheres com endometriose nos graus III e IV foi em 1986. Teria sido também a primeira vez que se levantou a hipótese de um teste sanguíneo para o diagnóstico desta patologia (Nisole, 2001).

Barbieri e Missmer (2002) relatam que em 147 mulheres submetidas a laparoscopia/laparotomia diagnóstica, o CA-125 pré-operatório estava aumentado em mulheres com endometriose graus III/IV, se comparado com mulheres do grupo controle, com laparoscopia/laparotomia normais.

Conclusões dos mesmos autores, também indicaram aumento do marcador, caso de grau II de endometriose (13%), leiomioma uterino (14%) e DIP crônica (5%). O estudo mostrou

ainda que as lesões de endometriose aumentam a expressão do CA-125 também por técnicas imunocitoquímicas (Nisole, 2001).

Segundo Nisole (2001), existem outros marcadores que são úteis no diagnóstico da endometriose como os níveis de integrina endometrial, auto-anticorpos anti-endometriais e expressão do endométrio eutópico da P450-CYP19 (aromatase).

No caso de marcadores como o CA15-3 e CA19-9, antígeno cárcino-embriônico(CEA), alfafetoproteína (AFP) e beta-2 microglobulina (B2MG), seu comportamento nas mulheres com endometriose em diferentes fases do ciclo menstrual, vem sendo motivo de estudos. CA 15-3 e CA19-9 revelaram pequenas variações em suas concentrações, porém sem significância estatística que pudesse ser aproveitada em termos diagnósticos ou de seguimento. Não apresentam, portanto significado principalmente ao serem comparados aos demais marcadores estudados (Marques *et al.*, 2005; Abrão, 2001). Um estudo em especial, dosando os valores médios desses marcadores em portadoras de endometriose I, II, III e IV, no 1º, 2º, 3º dias do ciclo e no 8º,9º e 10º dia, mostrou que as dosagens séricas do CEA, AFP e B2MG se aproximaram do normal em todos os casos (Abrão *et al.*, 2007).

Podgaec *et al.* (2008) realizaram um estudo para avaliar os marcadores biológicos no sangue e fluido peritoneal de pacientes portadoras de endometriose e sua relação com a classificação histológica da doença. Os autores analisaram a relação e a predominância dos padrões de resposta imune Th1 e Th2 em pacientes com endometriose. Entre fevereiro de 2004 e abril de 2005 foram avaliadas 98 pacientes divididas em dois grupos de acordo com a presença (Grupo A) ou ausência de endometriose (Grupo B), confirmada histologicamente. Foram coletados sangue periférico e fluido peritoneal de todas as pacientes para a dosagem de interleucinas (IL) 2,4 e 10, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e interferon-gama (IFN-gama) por citometria de fluxo. Neste estudo, observou-se elevação de citocinas relativas à resposta imune Th2, denotando haver um predomínio deste padrão de resposta em pacientes com endometriose.

1.5 Endometriose e Infertilidade

A relação entre a endometriose e infertilidade vem sendo demonstrada claramente na literatura. Torna-se evidente o efeito que a endometriose tem nas etapas avançadas sobre a fertilidade pelas ações de aderências sobre as trompas e ovários (Gómez *et al.*, 1997).

A infertilidade pode ser definida como sendo a incapacidade de conceber um filho após um ano de tentativas regulares sem a utilização de qualquer método contraceptivo (Shah *et*

al., 2003). Aproximadamente 15% de todos os casais que desejam ter filhos serão afetados pela infertilidade que pode estar relacionada a diversos fatores. Entretanto, cerca de 20% desses casais são diagnosticados como infertilidade idiopática (Trummer *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais a endometriose leva à infertilidade ainda não são totalmente conhecidos. Em mulheres com endometriose em estágio mais avançado, as alterações anatômicas, como obstrução tubária, aderências entre as estruturas pélvicas podem perfeitamente explicar a infertilidade em consequência de comprometimento da postura ovular, da captação do oócito e/ou do transporte do embrião. No entanto os mecanismos pelos quais a endometriose causa infertilidade em pacientes que não apresentam modificações anatômicas importantes (endometriose mínima ou leve) ainda não são bem esclarecidos. Os possíveis mecanismos pelos quais a endometriose ocasiona a infertilidade são a interferência com a função sexual (dispaurenia, redução da frequência de coitos) e Interferência com a ovulação levando a anovulação, fase lútea deficiente, síndrome da luteinização do folículo não roto (LUF) (Moura *et al.*, 1999).

Para os autores Bedone *et al.* (1994) a endometriose, no que diz respeito a sintomatologia clínica comporta-se de maneira diferente do esperado. Na prática diária de consultório observam-se pacientes que apresentam sintomas exacerbados no que diz respeito às manifestações de dor e/ou infertilidade, mas que são diagnosticados laparoscopicamente como tendo endometriose mínima. Por outro lado, também não é raro o diagnóstico ocasional de pacientes em graus mais avançados da doença e que são completamente assintomáticas no que diz respeito aos sintomas clínicos e à possibilidade de gravidez.

1.5.1 Disfunção Ovariana

Quando presente no ovário, os cistos endometrióticos podem ter vários centímetros e são chamados endometriomas ou “cistos de chocolate” (Muse *et al.*, 1994) (Figura 6).

No ovário, a endometriose se comporta de maneira diferente do que nos outros tecidos. Isso ocorre devido à alta concentração de hormônios e fatores de crescimento presentes no interior do ovário. Sua integridade estrutural é alterada pela formação de cistos funcionais e sua superfície é interrompida temporariamente no período da ovulação (Nezhat *et al.*, 1992).

De acordo com Brosens *et al.* (1989) o aprofundamento das lesões com a formação dos endometriomas parece ser o resultado do processo seqüencial. A partir dos implantes superficiais, há formação de aderências, invaginação do córtex, implantes na parede cortical

invertida, secreção de material sanguinolento e formação de cisto. Nos cistos maiores é comum a combinação com a presença de cistos hemorrágicos funcionais.

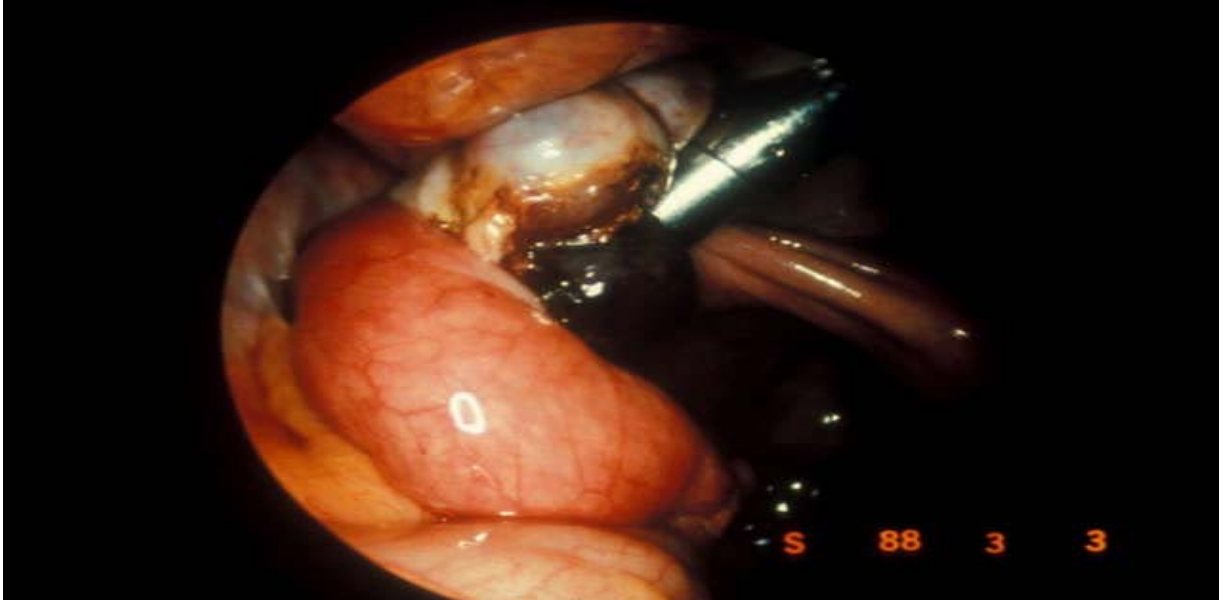


Figura 6 - Endometrioma ovariano. Sangramento “achocolatado”. Fonte: Ribeiro Júnior *et al.*, 2009.

A distensão progressiva do cisto com fibrose da parede esconde a lesão original e produz superfície de pigmentação escura, fibrótica e pobre em vascularização. Por este processo, a endometriose superficial do ovário parece resultar em endometriose dita profunda, ou endometrioma (Reich *et al.*, 1991). A análise ultra-sonográfica detectou LUF nas pacientes com diagnóstico de endometriose entre 4 a 34% dos casos. A síndrome do folículo não roto e luteinizado foi proposta como um fator facilitador para o desenvolvimento da endometriose (Koninckx, 1992), uma vez que a concentração de progesterona no fluido peritoneal era muito inferior a obtida nas mulheres ovulatórias. A disfunção ovulatória, como anovulação tem sido descrita em pacientes com endometriose numa incidência variando de 17% a 27%, embora não se saiba ao certo qual o mecanismo envolvido. Uma possibilidade seria a hiperprolactinemia. O modo pelo qual a endometriose levaria a uma hiperprolactinemia é discutível, embora se acredite no papel da inervação do peritônio parietal (nervos torácicos), que estimulada pelo processo inflamatório levaria a maior produção de prolactina, como ocorre pelo estímulo da amamentação (Marques, 2005).

A síndrome de LUF, síndrome do folículo luteinizado não roto, em outras palavras ocorre quando o folículo ovariano desenvolve-se normalmente, mas não rompe para liberar o óvulo; depois, as células que o compõe iniciam a secreção de progesterona, tal como um

folículo que rompeu e se transformou em corpo lúteo, daí as dosagens de progesterona serem normais (Acosta *et al.*, 1996).

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

1.5.2 Distúrbios de Implantação

Há evidências de produção de anticorpos antiendometriais em pacientes com endometriose, detectados nos implantes através de técnicas de imunofluorescência e no soro das pacientes. Discute-se que esses anticorpos poderiam interferir no fenômeno de implantação do zigoto e até contribuir para abortamento precoce nessas pacientes (Vigano *et al.*, 1991).

Sabe-se também que o endométrio das pacientes com endometriose possui a enzima aromatase p450, Cyp19, que não existe no endométrio de mulheres sadias. Este distúrbio relacionado à síntese e à metabolização de estrogênios gera ambiente hiperestrogênico, de cunho proliferativo, contribuindo de forma importante para o estabelecimento da doença (Carvalho *et al.*, 2004).

Inúmeros autores (Yáñez *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2004) já demonstraram a expressão exagerada de receptores de estrogênio nos implantes de endometriose, e também, o que parece importante, defeitos no receptor de progesterona. As alterações, descritas acima, são conseqüência da anormalidade do efeito progestacional sobre o endométrio tópico e ectópico.

A progesterona regula a maior secreção de collagenases, bem como a menor expressão de seus fatores inibidores, a secreção de peptídeos angiogênicos, o controle do ciclo celular e a metabolização dos estrogênios nas células endometriais. Alterações da sua função podem, portanto, facilitar o aparecimento da moléstia, porque, no sentido amplo, deixam de antagonizar os efeitos proliferativos dos estrogênios (Nakata *et al.*, 2004).

Segundo Nakata *et al.* (2004) acredita-se que a presença de concentrações altas de progesterona no fluido normal poderia dificultar a implantação, a sobrevivência e a proliferação das células endometriais regurgitadas da cavidade uterina; produção contínua de progesterona até a fase folicular seguinte. Assim como a falha de uma luteólise adequada; diminuição da produção de células da granulosa; Interferência na captação do óvulo aderências peri-ovarianas; aderências tubo-ovarianas; fixação dos ovários; inibição da captação ovular; Interferência com o transporte do óvulo (aumento da motilidade tubária); salpingite crônica; aumento no volume do líquido peritoneal; Interferência com a fertilização aumento da fagocitose dos espermatozoides pelos macrófagos; diminuição da penetração espermática; diminuição da fertilização; diminuição da clivagem; Interferência com a implantação defeitos da fase lútea; anticorpos anti-endometriais; Interferência com outros hormônios aumento da secreção de prostaglandinas; associação com hiperprolactinemia; duplo pico de LH; e a Interferência com o desenvolvimento da gestação alterações na clivagem e desenvolvimento embrionário; aumento dos abortos espontâneos (Nakata *et al.*, 2004; Halme *et al.*, 1984).

Segundo Carvalho *et al.*, 2004 o equilíbrio entre estrogênios e progesterona identifica o endométrio saudável e o desequilíbrio desencadeia sinais importantes ao desenvolvimento de endometriose.

1.5.3 Fatores Imunológicos

Recentemente em 1980 segundo Podgaec *et al.*, 2007 os fatores imunológicos foram inseridos como facilitador dos implantes ectópicos do tecido endometrial. O sistema imune parece estar envolvido na patogênese da endometriose, visto que a enfermidade apresenta característica de doença inflamatória crônica (Bulun *et al.*, 2003).

A falha de um possível sistema imunológico local de proteção instala-se a doença endometriótica nas formas penetrantes dos septos reto-vaginais, adenomiose ou no ovário, com a formação de endometriomas. As células como os linfócitos T (Timo dependente) e B (sistema imune), macrófagos, monócitos, granulócitos e células naturais *killer* foram envolvidas juntamente com os fatores solúveis como as citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL1, IL6, IL8), frações do complemento, lisozimas, proteínas inflamatórias da fase aguda e imunoglobulinas (Redelara, 2008).

As células endometriais na cavidade peritoneal são identificadas como antígenos, e estão sujeitas a resposta imune local. Os macrófagos agem como antígenos, e por meio de

histocompatibilidade nos complexos presentes na superfície da célula, formam-se antígenos anti linfócitos T. Existem grande histocompatibilidade nas moléculas de classe I e II. Quando o antígeno se liga a molécula de classe I, os linfócitos T citotóxicos, são atraídos. Quando vinculando a molécula de classe II, os linfócitos T *helper* são atraídos. Resumindo, podemos dizer que os linfócitos T podem liberar substancias tóxicas letais para célula alvo e os linfócitos T *helper* secretam citocinas que tem atividades diferentes e podem estar relacionadas á gênese da endometriose (Podgaec *et al.*, 2007; Benjamini *et al.*, 2002).

Por outro lado, há um aumento de subpopulações de leucócitos e sua atividade no líquido peritoneal reflete os efeitos citotóxicos contra os espermatozóides, oócitos, interação de gametas e desenvolvimento embrionários. Há também um aumento na secreção de citocinas e fatores de crescimento que favorecem e estimulam o crescimento dos focos endometrióticos em um ambiente de tolerância imunológica (Gómez, 1997).

Ainda hoje se desconhece a causa específica da endometriose. Os componentes do sistema imunológico podem estar afetados e ter um papel central na fisiopatogenia da doença, alterando todo o meio ambiente peritoneal (Gómez, 1997).

Atualmente pode-se demonstrar que as células endometriais tóxicas de mulheres com endometriose são distintas, em vários aspectos, das células de mulheres sem endometriose (Rodrigues *et al.*, 2009). De fato, o endométrio ectópico de endometrióticos apresenta inúmeras modificações. Há maior atividade de aromatase, o receptor de progesterona não funciona e, portanto, a atividade progestacional é deficiente fazendo com que a atividade de 17-beta HSD esteja reduzida, assim como a apoptose. Portanto, tudo isso leva a uma situação de hiperestrogenismo local, já confirmado por aumento de lisossomas, do KI-67 e diminuição da P27, da Tob-1 e da P53 . Outro fator importante é que a progesterona ativa o fator inibidor tissular de metaloproteinases. Havendo déficit local de progesterona há mais atividade de metaloproteinases, permitindo maior invasão celular. Analisando os aspectos histológicos e bioquímicos das células endometriais de mulheres com endometriose e sem a patologia, o aspecto histológico, ao longo do ciclo, é similar nos dois grupos, portanto, a morfologia é normal, mas o comportamento bioquímico (endógeno) é diferente e, o endométrio, é então dito disfuncional (Ackerman *et al.*, 2002). Todos estes fatores interligados a gatilhos ambientais e situações de estresse, que é comum na mulher moderna, modulam o sistema de defesa e precisam ser melhor compreendidos para que a gênese da patologia seja esclarecida.

1.5.4 Fatores Genéticos e Endometriose

A endometriose é caracterizada pela presença e crescimento de células endometriais fora do útero, comprometendo a fertilidade, e estudos (Wenzl *et al.*, 2003 ; Halis *et al.*, 2004) reafirmam que a doença tem um forte fator genético (Tempfer *et al.*, 2008; Viganò *et al.*, 2007; Treloar *et al.*, 1999). Este fator tem sido foco de inúmeros estudos correlacionando a doença com diversos polimorfismos (Tempfer *et al.*, 2009).

A tendência familiar ou racial na ocorrência da endometriose tem sido objeto de estudos genéticos. O risco genético pode estar associado a um ou mais genes que agem de forma multiplicativa. Missmer (2004) reafirma em seus estudos que, a endometriose pode ser hereditária de forma poligênica. O genoma dos indivíduos é 99% idêntico, com apenas 1% do genoma apresentando polimorfismo, que são caracterizados como variações de seqüências, que ocorrem em mais de 1% da população e não estão necessariamente associados com doenças, podendo apresentar papel protetor ou deletério no sentido de interferir na idade ao diagnóstico (mais precoce) ou velocidade de progressão (mais acelerada) da doença (Wild *et al.*, 2007).

Publicações envolvendo polimorfismos têm aumentado nestes últimos vinte anos, passando de 470 artigos publicados em 1976, para aproximadamente 12.000 em 2006 no Medline. O interesse no estudo de polimorfismos reside no fato de que as variações nas seqüências genômicas estão por trás da suscetibilidade de desenvolver, ou da capacidade de evitar doenças como o câncer de mama. Estas diferenças podem indicar o surgimento da doença, a intensidade e que tipo de tratamento será o mais efetivo (Wild *et al.* 2007).

A proliferação de tecido endometrial ectópico tem sido alvo de diversos estudos onde com a evolução da biologia molecular, consegue-se aprofundar na pesquisa de marcadores moleculares na busca do esclarecimento da endometriose. Os estudos de polimorfismos de baixa penetrância de diversos genes têm sido associados a maior ou menor suscetibilidade a determinadas doenças e se tornam importantes quando são muito prevalentes em uma determinada população. Esses genes são divididos em diversos grandes grupos: os envolvidos no metabolismo de esteróides (*COMT*, *CYP19*, *CYP17*, *CYPD6*, *ER*, e *PR*), os que codificam enzimas importantes no metabolismo de carcinógenos (*CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NAT1*, e *NAT2*), os relacionados ao ciclo celular (*STK15* e *ATM*) e os alelos comuns em genes como *BRCA1* e *TP53* (Kanna *et al.*, 2004) .

Em relação às enzimas CYPs, uma das mais extensivamente estudadas é a *CYP1A1*. Uma vez que a expressão do gene *CYP1A1* parece ser regulada na transcrição por fatores resultantes do estresse oxidativo; sua elevada atividade pode também ser deletéria e contribuir para a suscetibilidade a algumas, doenças; incluindo-se a endometriose. Um polimorfismo de

restrição *MspI* (*CYP11A1*m1) na região 3' não codificante do gene, resultante da transição de uma timina para citosina (T→C), parece promover aumento da sua expressão (Rossit *et al.*, 2000; Baranova *et al.*, 1987).

Sabe-se também que o endométrio das enfermas possui a enzima aromatase p450, *CYP19*, que não foi encontrada no de mulheres sadias. Este distúrbio relacionado à síntese e à metabolização de estrogênios gera ambiente hiperestrogênico, de cunho proliferativo, contribuindo de forma importante para o estabelecimento da doença (Carvalho *et al.*, 2004). Inúmeros autores já demonstraram a expressão exagerada de receptores de estrogênio nos implantes de endometriose, e também, o que parece importante, defeitos no receptor de progesterona (Bergqvist *et al.*, 1996 ; Nissole *et al.*, 1997 ; Carvalho *et al.*, 2004).

Recentemente, vários polimorfismos do receptor de progesterona têm sido descritos. Dentre eles destaca-se o polimorfismo PROGINS, que consiste em uma inserção *Alu* de 306 pb no intron G entre o exon 7 e 8 do gene do receptor de progesterona humano (Donaldson *et al.*, 2002). As alterações, descritas acima, são conseqüência da anormalidade do efeito progesteronal sobre o endométrio tópico e ectópico, onde os estudos de genes *PROGINS* têm sua importância no esclarecimento da etiopatologia da endometriose (Carvalho *et al.*, 2004).

Os subtipos do receptor de progesterona são expressos, e a sua concentração varia de acordo com a fase do ciclo menstrual. Entretanto, parece que os efeitos antiproliferativos da progesterona sobre o endométrio são mediados principalmente pela isoforma A do receptor de progesterona. A ativação da isoforma B, na ausência do receptor tipo A, leva a aumento da proliferação no epitélio. Portanto, havendo a predominância da isoforma B, não há adequada ação da progesterona, especulando-se, desse modo, que talvez essa alteração esteja relacionada à gênese da endometriose (Mulac *et al.*, 2000).

Rowe *et al.* (1995) observaram alterações fenotípicas decorrentes dos polimorfismos do gene do receptor de progesterona, sugerindo que esta inserção *Alu* seria responsável por alterações na transcrição do gene desse receptor, tanto por recombinação ou por alteração no *splicing* do transcrito primário. O polimorfismo PROGINS tem sido estudado em associação com afecções estrogênio-dependentes (Kurz *et al.*, 2001).

Wieser *et al.* (2002) estudaram a freqüência desta mutação em mulheres com endometriose; encontraram-na em 28% dos casos e em apenas 14% das sadias. Todos os dados indicam que uma mutação no gene do receptor da progesterona, seja qualquer uma das mencionadas acima, contribui para o desenvolvimento de doenças em tecidos hormônio dependentes, inclusive na endometriose.

Dentre as enzimas GSTs (*glutathione -S transferase*) mais conhecidas no estudo da endometriose estão as *GSTT1* e *GSTM1*. O gene *GSTM1* é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais ativos que apresentam a mesma eficiência metabólica e um alelo com atividade nula. Este último não sintetiza seu produto protéico devido a grande deleção no gene. Homozigotos para o alelo *GSTM1* nulo são considerados grupo de risco, principalmente se expostos a elevados níveis de carcinógenos e compostos químicos, devido ao defeito enzimático em seu sistema de detoxificação. Assim como o gene *GSTM1*, o *GSTT1* também é polimórfico na população humana, podendo apresentar fenótipo nulo por deleção (Nakata *et al.*, 2004).

1.5.5 Proteína p53

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo então referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (Lane e Crawford, 1979). Sob condições fisiológicas normais, apresenta uma meia vida muito curta, calculada em seis minutos, tornando difícil sua detecção em razão da rápida degradação, o que não ocorre com o acúmulo da forma mutada no núcleo da célula, podendo ser facilmente detectada por técnicas de imuno-histoquímica, *Western blot*, ou por citometria de fluxo.

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

A proteína p53 é constituída por 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína (Figura 7)

O dano ao DNA desencadeia rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da fosforilação da proteína.

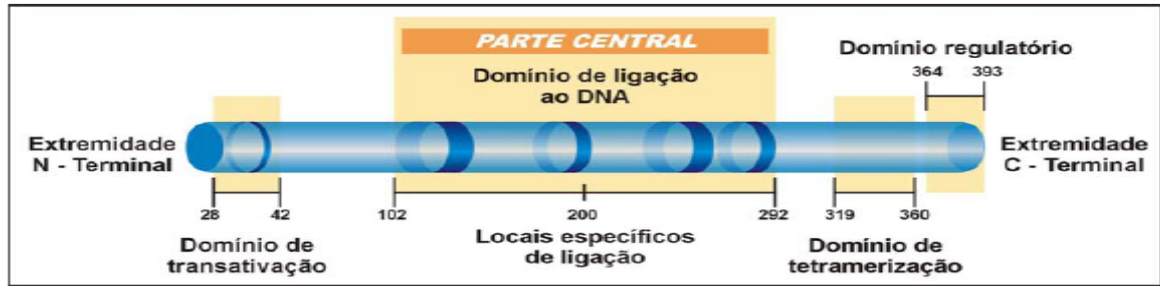


Figura 7 - Desenho esquemático da proteína p53, mostrando a localização de regiões distintas com diferentes funções. Cada domínio é responsável por uma determinada função da proteína Tp53. Fonte: Júnior *et al.*, 2009.

Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a super expressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA. No início do ciclo mitótico, o gene *p53* ativa transcricionalmente o gene *p21*, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* (*Growth Arrest DNA Damage Inducible*), que atua corrigindo a lesão no DNA (Cavalcanti Júnior *et al.*, 2002).

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

O primeiro chamado de domínio de transativação está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal), estando compreendido entre os aminoácidos 28 e 42, sendo responsável por regular a expressão de genes que atuam na mediação da parada do ciclo celular e apoptose (Klumb *et al.*, 2002).

Na região central existem quatro domínios de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 102 e 292, que possibilitam a ligação de p53 em sítios específicos do DNA. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal) existem dois domínios: o domínio de tetramerização, que situa entre os aminoácidos 319 a 360, é responsável pela formação de tetrâmeros de P53, que é a forma mais ativa (selvagem ou *wild type*) em transativação; o domínio regulatório, que se situa entre os aminoácidos 364 a 393, cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao

DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (Silva *et al.*, 2003).

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

1.6 Receptores Celulares

1.6.1 Sinalização Celular

A intercomunicação celular é realizada através de moléculas sinalizadoras ou ligantes que podem ser proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides e gases (óxido nítrico e monóxido de carbono). Esta comunicação é essencial no controle de processos metabólicos, nos controles de crescimento, diferenciação celular e na integração fisiológica dos organismos vivos (Griffits *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2003) (Figura 8).

Os receptores são proteínas específicas que são produzidas pelas células alvo através de um sinal. Esta ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores específicos desencadeia vários processos metabólicos de respostas específicas dentro da célula alvo.

Através da ligação da molécula sinalizadora, é exercido o controle dos processos e respostas transcricionais (Taneja *et al.*, 2005; Rechavi *et al.*, 2003).

De acordo com a localização na célula os receptores dividem-se em dois grupos proteínas do tipo transmembrana que se localizam na superfície das células alvo que são ativados por molécula sinalizadora específica, que desencadeia processos intercelulares modificando o comportamento celular e localizados no interior das células alvo que requer a entrada de molécula sinalizadora no citosol ou no núcleo para serem ativados (Franzotti *et al.*, 2006). O sinal é recebido no interior da célula e só são desencadeadas suas ações depois que o complexo receptor-ligante interagir com seqüências específicas no interior do núcleo, são os receptores nucleares (Taneja *et al.*, 2005; Rechavi *et al.*, 2003).

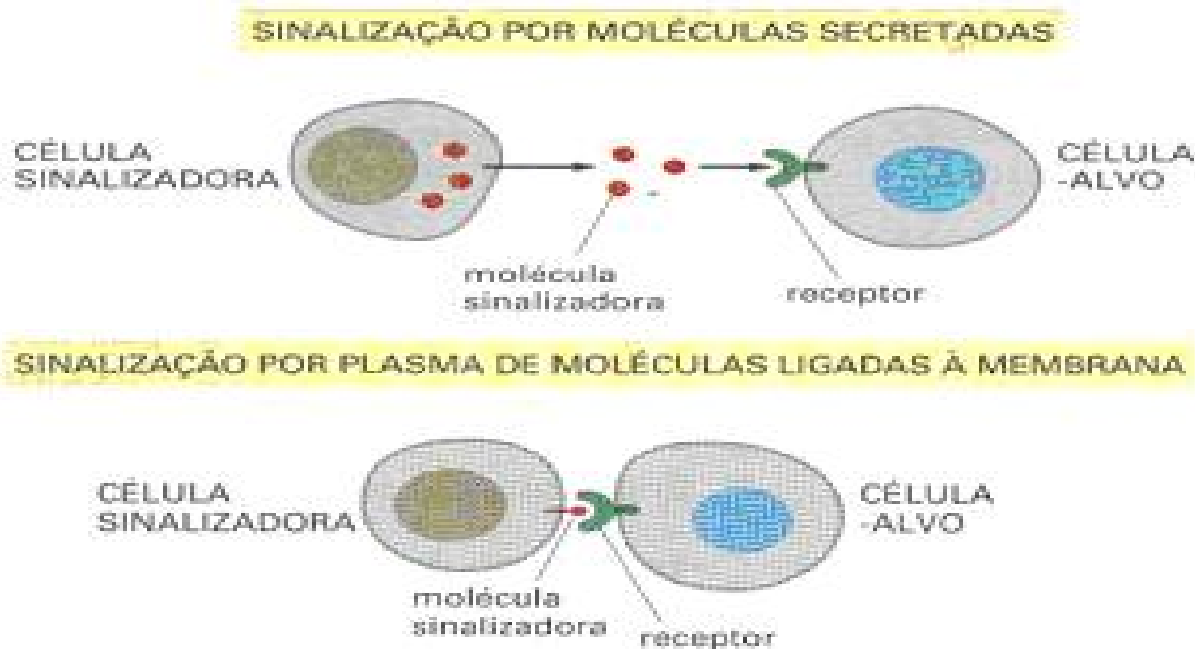


Figura 8 - Representando o esquema de sinalização por moléculas secretadas e por moléculas ligadas à membrana. Demonstrando a molécula sinalizadora e seu receptor. Fonte: Alberts, 2003.

Os receptores atuam em conjunto com os parceiros em complexos, denominados como co-ativadores, quando em presença de seu ligante natural, participando da ativação da transcrição e co-repressores quando participam da repressão da transcrição na ausência de ligante (Taneja *et al.*, 2005).

1.6.2 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares são proteínas que agem por meio da regulação da transcrição dos genes-alvo, mediando os efeitos dos hormônios na célula. Têm como principal característica regular a transcrição dos genes no interior das células.

A superfamília dos receptores nucleares compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes (Carpentier *et al.*, 2001). Esta superfamília que evoluiu a partir de um ancestral comum, inclui receptores para esteróides, vitamina D, retinóides, hormônios tiroideanos, e prostaglandinas, além de um grande número de receptores cujos ligantes naturais, ainda não foram identificados, são denominados de “receptores órfãos” (Gustafsson *et al.*, 2004; Lehmann, 1999). A análise filogenética tem demonstrado seis subfamílias (NR 1 – 6) com vários grupos e genes individuais (Figura 9).

Os receptores nucleares estão amplamente envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos e representam alvos terapêuticos para um grande número de doenças humanas incluindo câncer, doenças cardíacas, distúrbios endócrinos e metabólicos, doenças

reprodutivas, infertilidade e obesidade (Gustafsson *et al.*, 2004; Chawla *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001).

Por esta característica, atualmente são muito estudados em indústrias bioquímicas no mercado mundial dos fármacos (Gustafsson *et al.*, 2004).

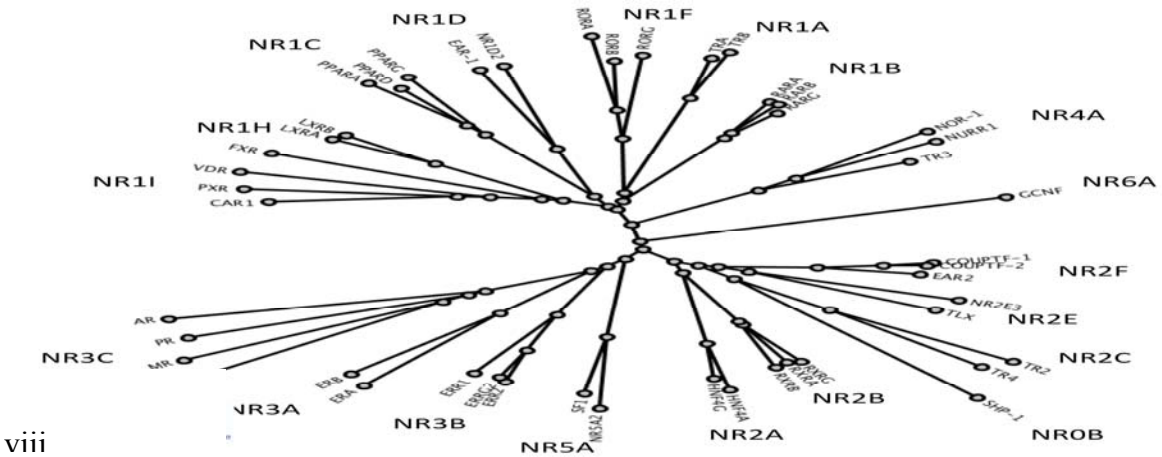


Figura 9- Representação esquemática da filogenia dos receptores nucleares com 6 subfamílias e os vários grupos e genes individuais. Demonstrando os receptores de estrógeno na subfamília 3A (NR 3A). Fonte: Heuvel , 2009.

Todos receptores partem de um composto estrutural básico similar, tendo um domínio específico do DNA altamente conservado; um domínio específico hormonal que é conservado entre os receptores de hormônios relacionados como o receptor de progesterona, o receptor do glucocorticóide, e o receptor do mineralocorticóide; uma região dependente localizada entre o domínio específico do DNA e o domínio específico hormonal; e um domínio amino-terminal, que é a região mais variável entre os membros desta superfamília (Gustafsson *et al.*, 2004; Gronemeyer, 1991) (Figura 10).

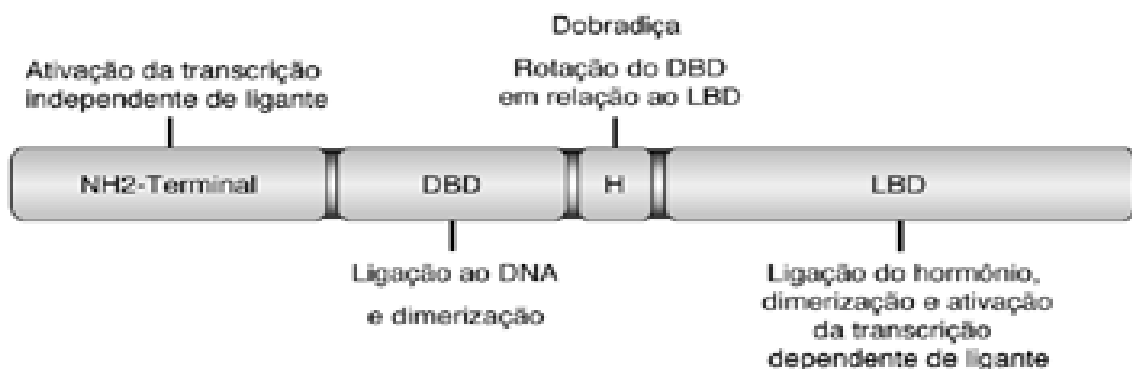


Figura 10 - Principais domínios funcionais de receptores de esteróides. Um Domínio aminoterminal (NH2), domínio de dimerização e ligação ao DNA (DBD), dobradiça do LBD em relação ao DBD (Hinge), domínio de ligação ao ligante (LBD). Fonte: Barra *et al.*, 2004.

No domínio amino terminal, também conhecido como A/B que contém o domínio de transativação AF1 (ativação da função 1) de tamanho e seqüência variados entre os membros das famílias, responsáveis pelo reconhecimento de co-ativadores e outros fatores de transcrição; contribui para a especificidade de ação entre as isoformas de um receptor e é alvo de fosforilação que podem afetar a atividade transcricional (Warnmark *et al.*, 2003; Treuter *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 1998).

DBD é o domínio mais conservado dos receptores nucleares e é composto por dois dedos de zinco e possui de 60 a 70 aminoácidos e na sua região N terminal possui as caixas T e A. É responsável pela ativação dos genes através do reconhecimento de seqüências específicas (elementos responsivos) e possui motivos de 9 cisteínas que fazem o LDB ter afinidade ao DNA. Alguns aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento de seqüências específicas de DNA ou motivos situados na base do primeiro dedo de zinco, são as caixas *P box*, enquanto que na região próxima ao segundo dedo de zinco está a *D box* envolvida no processo de dimerização. Este domínio possui um enovelamento em duas hélices, sendo que a primeira começa na terceira cisteína conservada (hélice de reconhecimento) ligada a cavidade principal do DNA em contato com bases específicas e a outra próxima ao C-terminal ao dedo de zinco forma um ângulo reto com a primeira, que é a hélice de reconhecimento (Ribeiro *et al.*, 1998).

Os receptores nucleares se ligam via DBD aos elementos responsivos, derivados do motivo AGGTCA. A forma como estes receptores se ligam está vinculada ao seu estado de oligomerização. Esta ligação ocorre de três maneiras: Como monômeros (receptores órfãos), homodímero quando se liga a sítio duplicado com palíndromo invertido (receptores de esteróides), e heterodímeros quando se liga a sítio duplicado com repetição direta (heterodímeros com RXR). Este fenômeno acontece devido a uma região presente na primeira hélice que é responsável pelo reconhecimento de resíduos expostos e que fazem a discriminação entre os diferentes sítios de ligação, modulando o padrão de ligação do receptor nuclear ao respectivo gene para desencadear sua atividade biológica (Wu *et al.*, 2001).

A região *hinge* (dobradiça) ou domínio D, é a porção conectora entre os domínios LDB e DBD e esta conexão permite o movimento de um módulo sobre o outro. Não é um domínio conservado entre os receptores nucleares em muitos casos ligados a sinalização interferindo em nível de cessar as interações entre receptores e co-repressores (Wu *et al.*, 2001; Yen, 2001).

LDB é o domínio de ligação ao ligante e tem múltiplas funções. Atua como desencadeador do mecanismo de ação dos receptores nucleares, localização nuclear, homo-

heterodimerização, associação com repressores e coativadores, proteínas de choque térmico, e possui a região de transativação AF-2 ou função de ativação ligante dependente. Nesta região os receptores nucleares possuem uma fraca ativação via domínio AF-2 ou AD. O enovelamento LDB é constituído de 12 hélices α numerada 1 a 12 numa folha β (entre as hélices 5 e 6) organizadas em um *sandwich* “ α –helical”. O tamanho da cavidade hidrofóbica formada varia entre os membros da família dos receptores nucleares e entre os estados onde o receptor se liga ao ligante (holo) e na ausência do ligante (apo). A estrutura holo é mais compacta e confere a proteína uma maior estabilidade (Wu *et al.*, 2001; Yen, 2001).

1.6.2.1 O Receptor de Estrógeno (RE)

O hormônio estrogênio tem um importante papel para os processos fisiológicos nas mulheres e homens. Está envolvido no crescimento, diferenciação e na função de tecidos reprodutivos, incluindo ovários, útero, glândulas mamárias, vagina e próstata nos machos. Também participa das vias de manutenção de densidade óssea e no cérebro regula o comportamento reprodutivo, a produção de gonadotrofinas, a liberação de hormônios pela glândula pituitária, o humor e o comportamento social (Zhao *et al.*, 2000).

A ação estrogênica é mediada por receptores intracelulares, que com a ligação dos ligantes são translocados para o núcleo onde ativam a transcrição gênica. Existem dois subtipos de receptores de estrogênio (RE α e RE β) que apresentam distinção celular e diferenciação de distribuição tecidual (Sneige *et al.*, 2005).

Em 1995, estas isoformas da proteína receptora para o estrogênio foram encontradas, clonadas e caracterizadas em várias espécies inclusive em humanos, denominadas receptor estrogênico α (RE α) e receptor estrogênico β (RE β) (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1999). No entanto, uma função do estrogênio não foi descoberta até ratos sem receptores α de estrogênio, RE α *knockout* (α ERKO), ter sido produzido (Lubahn *et al.*, 1997). O rato α ERKO mostrou pela primeira vez que ER α é essencial para a fertilidade do macho (Eddy *et al.*, 1996). Este modelo animal foi desenvolvido para mostrar que o estrogênio fornece uma função fisiológica na regulação fluido-dinâmica no trato reprodutivo masculino, uma função que é "essencial" para o desempenho reprodutivo normal (Nakai *et al.*, 2001).

Estes dois tipos majoritários de RE (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) – 133430), têm estrutura similar, porém o RE β é menor que o RE α (National Center for Biotechnology Information, 2008). O RE β humano chega a ter 47% de homologia com o RE α

humano e ser cerca de 89% idêntico ao RE β de ratos e camundongos. A estrutura proteica dos RE humanos apresenta 97% de homologia no domínio de ligação ao DNA (região C) e 59,1% no domínio de acoplamento ao ligante (região E) (Enmark *et al.*, 1999; Koehler *et al.*, 2005).

A biossíntese dos receptores estrógenos é catalisada pela aromatase citocromo P450 que é produto do gene *CYP19*. No ser humano, vários tecidos têm a capacidade de expressar aromatase e, conseqüentemente, sintetizar estrógenos, dentre eles incluem os ovários e testículos.

O estrogênio ovariano tem um importante papel na diferenciação, maturação e função do sistema reprodutivo em fêmeas, e também a distribuição do tecido adiposo através do sistema endócrino e efeitos parácrinos mediados pela ativação dos receptores de estrogênio (RE/ER) (Enmark *et al.*, 1999; Ackerman *et al.*, 2002).

O estrogênio é um hormônio lipofílico que ultrapassa a membrana celular e interage com seus receptores específicos, presentes no núcleo de células alvo, onde regula a expressão gênica (Chlebowski *et al.*, 2002). A primeira reação, a conversão do colesterol em esteróides nos carbonos C18, C19 e C21, envolve a clivagem de um grupo de 6 carbonos do colesterol e este é o passo principal, regulador e determinante da velocidade da reação de biossíntese de esteróides (Ackerman *et al.*, 2002).

O sistema enzimático que cataliza a reação de clivagem é conhecido por desmolase e pode ser encontrado na mitocôndria de células produtoras de esteróides. A desmolase mitocondrial é um sistema enzimático complexo, sendo constituído pelo citocromo P450 e adrenodoxina (um agente redutor do P450). A atividade de cada um destes componentes aumenta através de processos dependentes da cAMP e da PKA. Primeiramente, a cAMP estimula a PKA, levando à fosforilação de uma colesteril-éster esterase e gerando elevadas concentrações de colesterol, que é o substrato da desmolase. Seguidamente, dá-se a regulação em longo prazo no gene para a desmolase.

Este gene contém um elemento regulador da cAMP (CRE) que se liga à cAMP e aumenta o nível da transcrição do RNA da desmolase, levando assim a uma grande concentração da enzima. Finalmente, o colesterol é um regulador por feedback negativo da atividade da HMG CoA reductase. Então, quando o colesterol citosólico se esgota, surge uma nova síntese do colesterol que é estimulada pela libertação da HMG CoA reductase da restrição do seu feedback. Subseqüentemente para a atividade da desmolase, a pregnenolona move-se para o citosol, onde o futuro processo depende da célula (tecido) considerada (Yager *et al.*, 1996; Cavalieri *et al.*, 2000). A classe de hormônios esteróides sintetizada por um dado tipo de células depende dos receptores do hormônio, da sua resposta à estimulação do hormônio e

do complemento enzimático expresso geneticamente. No caso do estradiol, o hormônio peptídico responsável pela estimulação da sua síntese é o FSH (hormônio folicular estimulante). De acordo com a teoria das 2 células, 2 gonadotrofinas se completam: o LH (hormônio luteinizante) estimula as células da teca produzirem androgênios, que serão aromatizados em estrogênio pelas células da granulosa sob estímulo do FSH. Assim, sintetizam novos receptores de FSH e LH (Silberstein, 2002; Freitas *et al.*, 2001; Speroff *et al.*, 1999) (Figura 11).

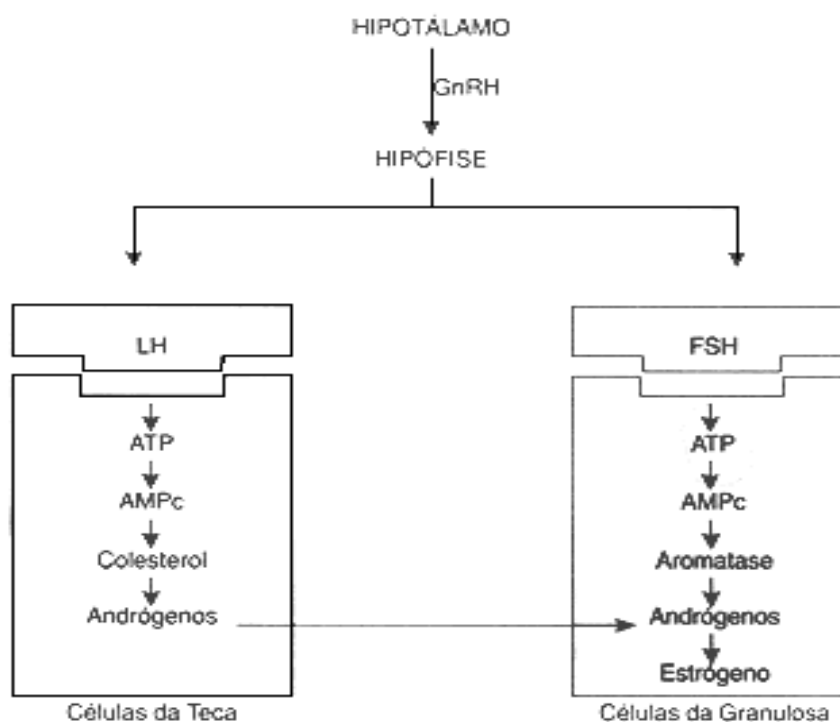


Figura 11 - Esquema da Teoria das duas células, demonstrando a função das gonadotrofinas no eixo hipófise-hipotálamo-célula na síntese de estrogênios pela aromatização de androgênios. Fonte: Franco, 2009.

Como citado anteriormente, estudos demonstraram que a secreção anormal de LH, atribuída a polimorfismos na subunidade β do gene *RE*, induz a anovulação, maturação prematura do oócito, anormalidades menstruais, síndrome dos ovários policísticos, abortos recorrentes e infertilidade, particularmente aquela relacionada à endometriose (Mafra *et al.*, 2008).

Em geral, o mecanismo de ação do $RE\beta$, embora sendo similar ao $RE\alpha$, o hormônio específico de inativação do $RE\beta$ monomérico, resulta na ativação e transativação conduzindo para a dimerização. A transativação do dímero $RE\beta$ conduz avidamente para a especificidade do RE localizada na região promotora do gene responsável pelo estrogênio. Contudo, o $RE\beta$

pode formar heterodímero com o RE α , expressando junto à célula alvo, ambas isoformas (Ogawa *et al.*, 1999).

1.6.2.2 Gene Receptor De Estrógeno (RE)

O gene do RE β foi mapeado e localizado no braço longo do cromossomo 14 no loco 2 entre os sublocos 23 e 24 (14q22-24) (Enmark *et al.*, 1997). (Figura 12.)



Figura 12 - Esquema do Cromossoma 14 loco 2 (q23-24). Demonstrando em vermelho o loco 2 onde situa o gene RE β . Fonte: UCSC Genome Browser, 2009.

A organização genômica do gene RE β humano, proteínas e domínios funcionais (figura 13).

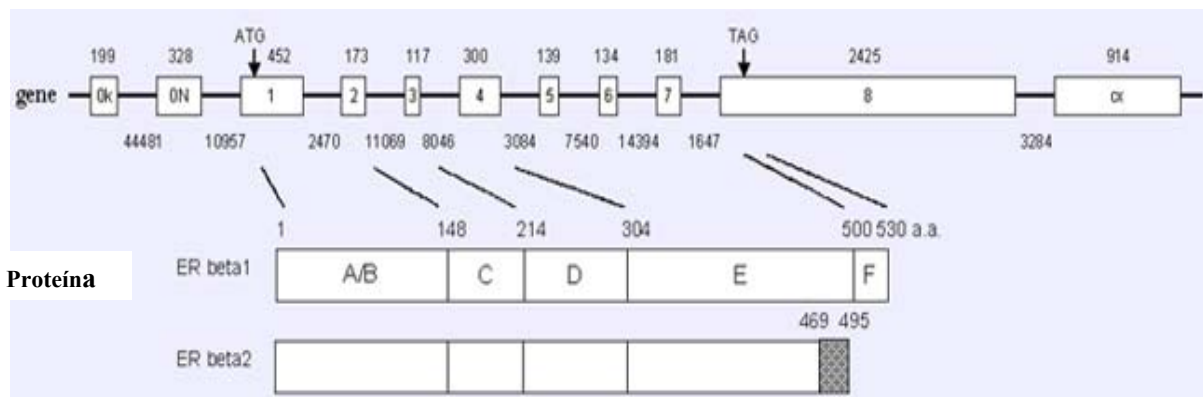


Figura 13 – Organização Genômica do gene RE beta humano, proteína e domínios funcionais. Gene: éxons são indicados com caixas e íntrons com linhas. Os números acima de cada caixa indicam o tamanho dos éxons (bp); os números abaixo de cada linha indicam o tamanho respectivo dos íntrons (bp). As linhas entre os gene e pontos de proteínas são os domínios das junções protéicas. Proteínas: O número indica o tamanho total do aminoácido da proteína. Na área pintada mostra a divergência das regiões C-terminal entre as isoformas. Descrição: O gene ER beta consiste de 8 éxons. A abertura de leitura da região codificada é 1,593 bp. Fonte: Gustafsson, 1999.

Mosselman *et al.* (1996) relataram pela primeira vez, o sequenciamento do cDNA RE β de humanos, anunciando uma proteína de 477 aminoácidos. Moore *et al.* (1998); Ogawa *et al.* (1999) clonaram o cDNA e encontraram 53 aminoácidos adicionais na região terminal amino (NH₂) do RE β . Recentes estudos confirmam a expressão do comprimento total da proteína RE β , contendo 530 aminoácidos. Após a primeira caracterização realizada por Tsukamoto *et al.* (1998) do dinucleotídeo altamente polimórfico repetido, no éxon 5 do gene humano RE β na população japonesa, os primeiros estudos foram ampliados para este gene.

O polimorfismo do gene *REβ* (*ESR2*) não foi caracterizado no primeiro trabalho em população japonesa (1998) e consistia numa repetição dinucleotídea altamente polimórfica no éxon 5; talvez por isso não existam muitos trabalhos que relacionam este gene com doenças ginecológicas. Atualmente já existem alguns trabalhos correlacionando o gene *REβ* e endometriose, isto pelo fato de que em 2002 foi descrito os polimorfismos *RsaI* e *AluI* em mulheres chinesas com disfunções ovarianas (Galliano, 2009).

Cinco diferentes seqüências de variantes, incluindo duas mutações e três polimorfismos, foram detectadas por um screening de mutação sistemática. A primeira foi transição silenciosa T1421C no éxon 7; A segunda foi transição silenciosa G1082A no domínio de ligação do éxon 5; a terceira foi polimorfismo de nucleotídeo único A1730G na região 3'-untranslated do éxon 8 (Nakata *et al.*, 2004). As variantes polimórficas são caracterizadas no gene *REβ* e resumidas na Figura 14. A importância funcional destes polimorfismos não tem sido esclarecida, e diferença na distribuição dos genótipos entre as populações caucasianas e asiáticas tem sido descritas (Galliano, 2009).

Mais recentemente, cinco novos polimorfismos foram identificados em uma população africana. Três deles (C143T no éxon 1, A566T no éxon 2, e T1100G no éxon 5) são polimorfismos silenciosos, enquanto os outros dois trocam a seqüência de aminoácidos do *REβ*. Estes incluem A105G polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no éxon 1 correspondendo a isoleucina para valina por substituição no aminoácido na posição 3 e um T1057G SNP no éxon 5 determina a substituição da valina pela glicina na posição 320, na hélice 4 no domínio de ligação. A hélice 4 não participa diretamente na ligação, mas interage com os cofatores. Importante, é a análise *in vitro*, a presença da valina na posição 320 mostrando significativo decréscimo na atividade transcricional (Galliano, 2009).

Aschim *et al.* (2005) realizaram, pela primeira vez, estudo mostrando uma associação entre variantes genéticas do gene *REβ* e infertilidade masculina, e constataram a freqüência do genótipo *RsaI* AG aumentada em homens inférteis, comparado com grupo controle (Bordin *et al.*, 2009). Recentemente várias variantes do gene *REβ* foram descritas, incluindo o polimorfismo *RsaI*, que é super-expresso em disfunções ovulatórias. Neste polimorfismo ocorre a troca de bases guanina por adenina (G → A) na posição do nucleotídeo 1082, no éxon 5, do gene *REβ* (Ashim *et al.*, 2005).

Muitos aspectos da função reprodutiva feminina são fortemente influenciados por fatores genéticos. Numerosos estudos procuram num esforço conjunto para identificar os genes de susceptibilidade para doenças que afetam a fertilidade feminina como: Síndrome

dos ovários policísticos, endometriose, fibrose, câncer, falha ovariana prematura, perda recorrente de gravidez e pré-eclampsia (Tempfer *et al.*, 2009).

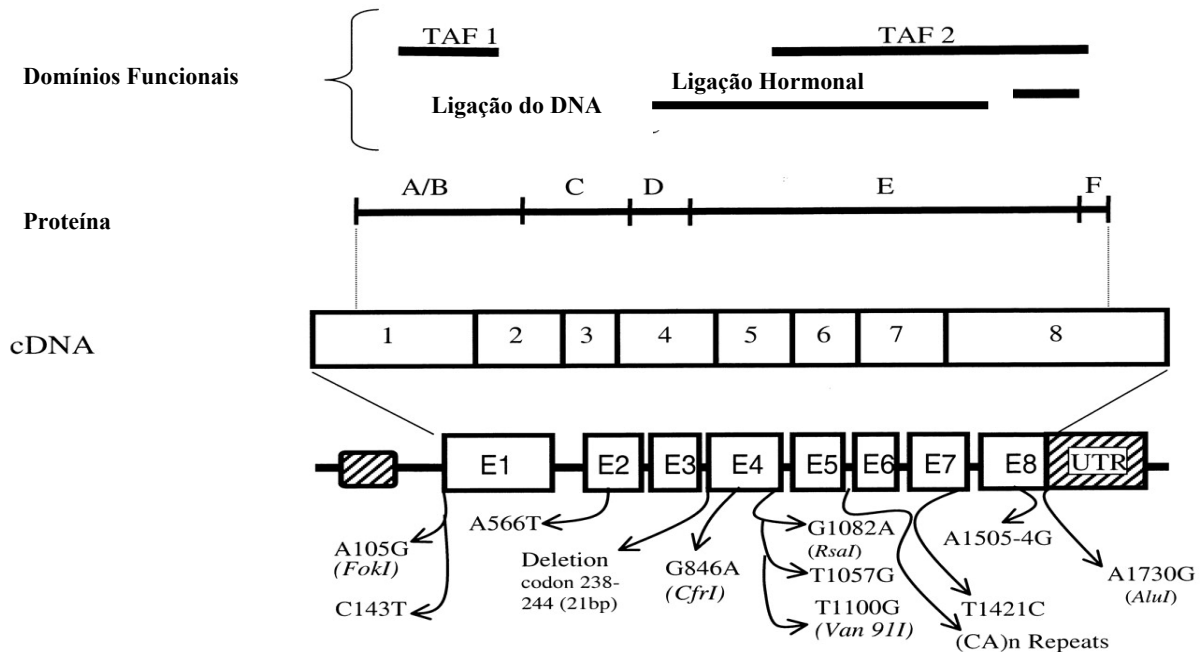


Figura 14 - Estrutura dos Domínios funcionais e descrição dos Polimorfismos do gene humano receptor β . éxons codificados e indicados dentro das caixas pela letra E. TAF, função de atividade transcricional; UTR, região não codificada. Fonte: Gennari *et al.*, 2005.

A desordem genética na endometriose, tem sido foco de diversos estudos associando uma grande variedade de polimorfismos á doença. Em mulheres japonesas, por exemplo, o estudo de Wang *et al.* (2004) detectou que o gene $RE\beta$ está relacionado a um risco aumentado no estágio IV da endometriose (Tempfer *et al.*, 2009).

Nos estudos de Matsuzaki *et al.* (2001), concluíram que ambas isoformas dos receptores de estrogênio (isoformas α e β) foram encontradas em células epiteliais e estromais nos tecidos endometrióticos em elevados níveis de expressão (Qin *et al.*, 2007). Bulun *et al.* (2010), em seus estudos relata que o evento inicial na endometriose pode ser a deficiência de metilação do $RE\beta$, resultando na super - expressão patológica deste receptor nas células estromais.

Como citado anteriormente existe diversas vertentes no aprofundamento do estudo da endometriose e a busca de desvendar sua enigmática etiologia. O estudo dos receptores de estrogênio e sua correlação com a doença podem esclarecer a etiologia genética da endometriose ajudando no diagnóstico e no tratamento. Assim como a metodologia de associação molecular, correlacionando os polimorfismos considerando os genes específicos e marcadores genéticos de interesse (Tempfer *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a frequência alélica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em mulheres com endometriose em relação as pacientes controles.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a frequência do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ*;
- Analisar os genótipos (AA, AG ou GG) do polimorfismo *RsaI* no gene (*REβ*) nas pacientes com clínica de endometriose e sem a clínica de endometriose;
- Analisar a distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com clínica de endometriose fértil e infértil;
- Analisar a distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em relação aos hábitos sociais como: fumo, ingestão de bebidas alcoólicas, anticoncepcionais e atividades físicas;
- Analisar a distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* e o polimorfismo p53 do códon 72 em pacientes com clínica de endometriose e sem a clínica de endometriose.

3. JUSTIFICATIVA

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

Na literatura, a incidência de endometriose nas mulheres com infertilidade varia de 6% a 58% (Wheeler, 1989; Hasson, 1976), ao passo que 30 a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (Thomas, 1995; Fedelle *et al.*, 1992).

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

O progresso no entendimento da etiologia da endometriose e prognóstico de infertilidade tem sido lento, devido à carência de estudos moleculares que investiguem as prováveis alterações genéticas associadas ao desenvolvimento e progressão da infertilidade.

Este estudo justifica-se como diagnóstico complementar pré-tratamento, possibilitando uma melhor indicação e conseqüentemente um melhor prognóstico na endometriose podendo assim correlacionar fatores clínicos, histológicos e moleculares na utilização de procedimentos em reprodução assistida, onde se tem expandido e sem o desenvolvimento concomitante de técnicas moleculares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram coletadas 100 amostras de sangue periférico de mulheres para análise molecular de DNA para o gene $RE\beta$ e p53. As amostras foram separadas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência da endometriose, grupo com endometriose com 54 mulheres com diagnóstico laparoscópico de endometriose com idade entre 25 e 35 anos denominado grupo com endometriose e 46 mulheres sem clínica da doença denominado grupo controle.

As pacientes com clínica de endometriose foram submetidas a videolaparoscopia para a confirmação da presença da endometriose (em qualquer grau) realizado pela Clínica Fértil Diagnósticos em Goiânia.

Após a realização da laparoscopia as 54 pacientes foram classificadas quanto ao grau da endometriose, de acordo com o número e a localização das lesões (*American Fertility Society* - revisada ou AFS-r): - Grau I (mínimo), Grau II (leve), Grau III (moderado), Grau IV (severo).

O sangue venoso (10 ml) das pacientes foi coletado no Laboratório Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás). Só foram submetidas a esta coleta de sangue venoso as pacientes que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da PUC – Goiás (Anexo II).

Foram formados dois subgrupos entre as pacientes com endometriose, quanto à fertilidade (fértil ou infértil). Todas as pacientes responderam a um questionário (Anexo III), sobre dados de idade, cor de pele, queixa de infertilidade, atividade física, consumo de fumo, álcool ou anticoncepcional que em conjunto chamamos de hábitos sociais.

4.2 Metodologia - Análise Molecular

4.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA do sangue periférico foi realizada seguindo-se as instruções de acordo com o fabricante do kit GFX™ (*Amersham Pharmacia Biotech*, EUA) protocolo para sangue total. A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Amersham Biosciences*, USA)

4.2.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A especificidade de um teste é a proporção de indivíduos sem a doença que tem um teste negativo e por outro lado, a sensibilidade de um teste é a proporção de pessoas com a doença que tem um teste positivo (Fletcher, 2007). A técnica de PCR foi realizada de acordo com o manual de biossegurança para evitar os vieses da reação tendo a acurácia de 100% e a identificação dos primers de 100% na seqüência sem gap (NCBI, 2010).

O uso da PCR com o primer específico para a variante polimórfica “A” e uma utilizando primer específico para a variante do tipo selvagem “G”. Cada reação foi feita juntamente com primers controles. Os primers (Tabela I) utilizados foram sugeridos por Aschim *et al.* (2005). As condições da PCR foram estabelecidas para gerar tanto um fragmento controle e um mais curto, banda alelo-específica, presença da variante ou só o fragmento controle na ausência da variante (Figura 15).

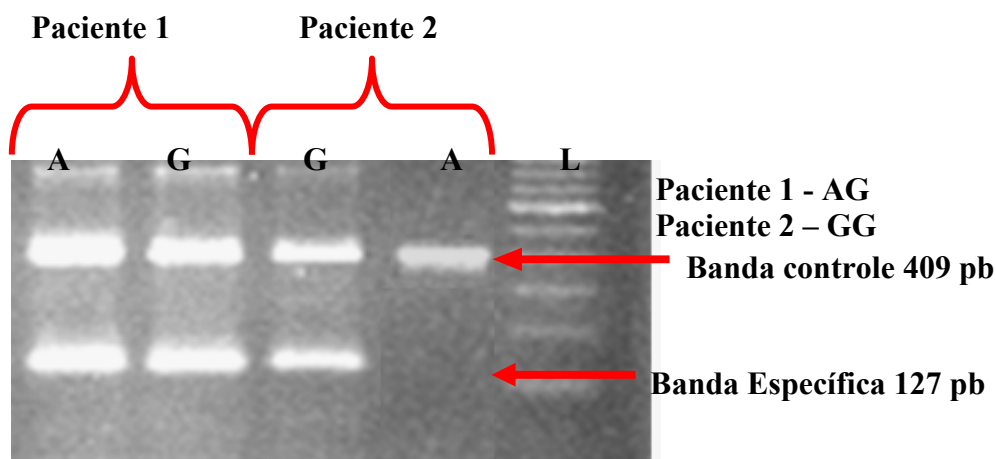


Figura 15: Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a cada primer utilizado na análise do polimorfismo RsaI do gene RE β . Paciente 1: Presença do polimorfismo heterozigoto AG; Paciente 2: Presença do homozigoto tipo selvagem GG; L: Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

Os possíveis resultados dos genótipos do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* com o uso destes *primers* são AA, AG ou GG.

Tabela I - Sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos para o gene *REβ*.

<i>Primer</i>	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do fragmento, pares de bases (bp)
<i>RsaI</i> Fw	ACT TGC CAT TCT GTC TCT ACA	
<i>RsaI</i> Rev Controle	CAC AGG ACC CTG AAT CCT	409 (controle)
<i>RsaI</i> RevA	AGC TCT CCA AGA GCC GT	127 (variante A)
<i>RsaI</i> RevG	AGC TCT CCA AGA GCC GC	127 (variante G)

Fw - *RsaI* Forward, Rev - *RsaI* reverse; Fonte: Aschim *et al.*, 2005.

O protocolo utilizado para a amplificação está especificado na Tabela II e Tabela III.

Tabela II - Protocolo para amplificação do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* (*RsaI* variante A, *RsaI* variante G).

<i>REAGENTES</i>	[] UTILIZADA	<i>VOL. P/ 1 AMOSTRA</i>
<i>RsaI</i> variante A		
Tampão(10x)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer Fw	20 µM	0,5 µL
Primer Rev controle	20 µM	0,5 µL
Primer Rev α	20 µM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	12,3 µL
DNA amostra	300 ng/µL	3 µL
Volume final		25 µL
<i>RsaI</i> variante G		
Tampão (10x)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer Fw	20 µM	0,5 µL
Primer Rev controle	20 µM	0,5 µL
Primer Rev G	20 µM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	13,3 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2 µL
Volume final		25 µL

Fw - *RsaI* Forward ; Rev - *RsaI* reverse ; dNTPs – deoxinucleotidotrifosfato; Fonte: Bordin *et al.*, 2009.

O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10mg/mL) em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. O gel foi submetido a um campo elétrico constante de 10 V/cm por um período de 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio a 5 µg/ml, por um período de 20 minutos. O registro visual do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (*Image Master VDS®* - Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As reações foram realizadas em duplicatas.

Tabela III - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* para as variantes A e G

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	96°C	3	1
Amplificação cíclica	96°C	1	35
	58°C	30 seg	
	72°C	3	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C		

Fonte: Bordin, *et al.*, 2009.

A detecção do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* (*Homo sapiens chromosome 14 genomic contig*) apresentou uma especificidade de 59% e uma sensibilidade de 93%. Com valor preditivo positivo de 91% e o valor preditivo negativo de 66%.

Também foi realizada a análise molecular para o polimorfismo no códon 72 do gene *p53* em DNA extraídos das amostras de sangue periférico dos dois grupos estudados. (Ribeiro Júnior *et al.*, 2009).

O produto obtido em cada reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose como descrito acima. Os possíveis resultados dos genótipos do polimorfismo no códon 72 do gene *p53*, na seqüência dos primers analisados das variantes, Arginina e Prolina do *p53* nas amostras de DNA (Tabela IV).

Tabela IV - Seqüência dos *primers* analisados nas amostras de DNA em pares de bases

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

Pb- pares de base; R- A/G; Y- C/T Fonte: Storey *et al.*, 1998.

O protocolo usado para a amplificação está especificado na Tabela V e VI.

Tabela V - Protocolo para amplificação do polimorfismo no códon 72 do gene *p53* (Arginina e Prolina)

<i>REAGENTES</i>	[] UTILIZADA	<i>VOL. P/ 1 AMOSTRA</i>
<i>Arginina</i>		
Tampão(10x)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 Mm	1,5 µL
dNTPs	2,0 Mm de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL	0,2 U/µL	0,2 µL
Primer Fw	0,5 µM	0,5 µL
Primer Rev controle	0,5 µM	0,5 µL
Primer Rev α	0,5 µM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	17,3 µM	12,3 µL
DNA amostra	200ng/µL	3 µL
Volume final		25 µL
<i>Prolina</i>		
Tampão (10x)	1X	2,5 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,2 µL
Primer Fw	20 µM	0,5 µL
Primer Rev controle	20 µM	0,5 µL
Primer Rev G	20 µM	0,5 µL
H ₂ O Mili Q	---	13,3 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2 µL
Volume final		25 µL

Fw - Forward ; Rev - Reverse; Fonte: Storey *et al.*, 1998.

O protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers* (Arginina), as temperaturas de desnaturação, amplificação, extensão e armazenamento com seus respectivos tempos e ciclos estão na Tabela VI.

Tabela VI - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* (Arginina)

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°C	5	1
	94°C	1	
Amplificação cíclica	59,4°C	1	35
	70°C	1	
Extensão final	70°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

Fonte: Ribeiro Júnior *et al.*, 2009.

O protocolo de termociclagem para amplificação dos *primers* (Prolina), as temperaturas de desnaturação, amplificação, extensão e armazenamento com seus respectivos tempos e ciclos estão na tabela VII.

Tabela VII - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers* (Prolina)

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°C	5	1
Amplificação cíclica	94°C	1	35
	56°C	1	
	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

Fonte: Ribeiro Júnior *et al.*, 2009.

O resultado esperado pode ser de homozigote AA (Arg/Arg), homozigote PP (Pro/Pro), heterozigote AP (Pro/Arg). O alelo arginina é representado por fragmentos de 141 pb enquanto o alelo prolina por 177 pb (Figura 16).

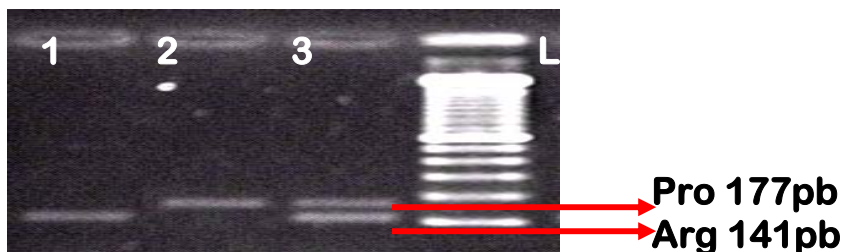


Figura 16 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, evidenciando as bandas referentes a cada primer utilizado na análise do polimorfismo no códon 72 do gene *p53* os alelos Arginina e Prolina do gene *p53* e seus pb. Paciente 1: Presença do homozigoto Arginina; Paciente 2: Presença do homozigoto Prolina; Paciente 3: Presença do heterozigoto Arginina/Prolina. L: Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

4.3 Análise Estatística

Foram realizados cálculos quantitativos de média e desvio padrão para as variáveis relativas aos pacientes e aos aspectos clinico-patológicas. O teste do Qui-Quadrado (χ^2) teste exato de Fisher, Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%, foram utilizados para a verificação de diferenças significativas entre a análise molecular e os hábitos sociais das pacientes.

Foi realizado o teste do χ^2 na análise estatística das frequências dos genótipos AA, AG, e GG do polimorfismo *RsaI* do gene *RE β* dos grupos estudados.

As frequências genótípicas das pacientes com endometriose foram comparadas com graus de classificação de vários estágios, de acordo com o número e localização das lesões segundo a “American Fertility Society” e nos grupos de fertilidade e infertilidade usou-se o teste exato de Fisher.

As frequências genótípicas Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro do polimorfismo *p53* das pacientes com endometriose foram comparadas aos controles utilizando teste exato de Fisher.

Frequência genotípica do *p53* em pacientes com endometriose foram comparadas á presença genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *RE β* utilizando o teste do χ^2 .

Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do pacote estatístico do *software* Bioestat (5.0) (*Sociedade Civil Mimirauá/MCT – CNPq*).

5. RESULTADOS

A média de idade observada no grupo das pacientes com endometriose, foi de 32,5 (DP \pm 2,9) e das pacientes controles foi de 37,4 (DP \pm 11,0), o valor $P = 0,007$ indicando que a diferença das idades entre os grupos é estatisticamente significativa (Tabela VIII).

Tabela VIII - Correlação entre as idades das pacientes com endometriose e controles.

Grupo	n	Idade Média	DP	P^a
Endometriose	54	32,5	2,9	0,007
Controles	46	37,4	11,0	

^aValor de P pelo teste do U Mann Withney

Ao analisarmos o polimorfismo do gene RE β as freqüências genotípicas encontradas nas pacientes com diagnóstico de endometriose (n=54) foi de 0% (0/54) do genótipo AA, 59,3% (32/54) do genótipo AG e 40,7% (22/54) do genótipo GG. Nas pacientes controles (n=46) 0% (0/46) foi do genótipo AA, 6,5% (3/46) do genótipo AG e 93,5% (45/46) do genótipo GG. A freqüência genotípica AA não foi encontrada em nenhum dos grupos estudados (endometriose e controle). A freqüência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo RsaI do gene RE β nas pacientes com endometriose foi aproximadamente 9 vezes maior do que nas pacientes controles, sendo estatisticamente significativa $P < 0,001$ (Tabela IX).

Tabela IX - Distribuição da freqüência alélica do polimorfismo RsaI do gene RE β das pacientes com diagnóstico de endometriose e pacientes controles.

Grupo/Genótipo	RsaI						P^a
	AA		AG		GG		
	n	%	n	%	n	%	
Endometriose (n = 54)	0	0	32	59,3	22	40,7	< 0,0001
Controle (n = 46)	0	0	3	6,5	43	93,5	

^aValor de P calculado pelo teste χ^2

O grupo de pacientes com diagnóstico de endometriose foi dividido em 2 subgrupos férteis e inférteis. A distribuição da freqüência alélica de pacientes férteis (n=25) foi de 68% (17/25) do heterozigoto AG e 32% (8/25) do homozigoto GG. Nas pacientes inférteis (n=27) o genótipo heterozigoto AG foi de 55,6% (15/27) e o genótipo homozigoto GG foi de 44,4%

(12/27). Verificou-se que a frequência alélica AG das pacientes férteis com endometriose foi de aproximadamente 10,5 vezes maior comparado com grupo controle, e a frequência alélica do genótipo AG das pacientes inférteis foi 8,5 vezes maior em relação aos controles e o genótipo GG nas pacientes férteis com endometriose foi de aproximadamente 3,0 vezes menor comparado com grupo controle e nas pacientes inférteis foi 2,0 vezes menor e relação aos controles. Sendo estatisticamente significantes, $P < 0,0001$ (Tabela X).

Tabela X - Distribuição da frequência alélica nas amostras de pacientes com diagnóstico de endometriose em subgrupos de pacientes férteis e inférteis e controles.

Grupos/Genótipos		<i>RsaI</i>						P^a
		AA		AG		GG		
		n	%	n	%	n	%	
Endometriose	Férteis (n = 25)	0	0	17	68,0	8	32,0	< 0,0001
	Inférteis (n = 27)	0	0	15	55,6	12	44,4	
Controles		0	0	3	6,5	43	93,5	

^a Valor de P foi calculado pelo teste do χ^2

Quanto ao grau de classificação da endometriose de acordo com o número e a localização das lesões (I/II ou III/IV) 94% (51/54) das pacientes informaram os resultados histológicos e 6% (3/54) não informaram (Tabela XI).

Detectou-se a frequência do genótipo polimórfico do gene $RE\beta$ nas pacientes com endometriose férteis do grau de classificação I/II (n=22) foi de 40,9% AG e GG (9/22) foi de 18,2% (4/22); Já nas pacientes com endometriose inférteis do grau de classificação I/II (n=22) detectou-se 27,3% (6/22) do genótipo AG e 13,6% (3/22) do genótipo GG. Verificou-se que a frequência alélica AG das pacientes férteis com endometriose do grau de classificação I/II foi de aproximadamente 1,5 vezes maior que as pacientes inférteis com endometriose do mesmo grau de classificação.

Quanto ao grau de classificação da endometriose de acordo com o número e a localização das lesões (I/II ou III/IV) 94% (51/54) das pacientes informaram os resultados histológicos e 6% (3/54) não informaram (Tabela XI).

Detectou-se a frequência do genótipo polimórfico do gene $RE\beta$ nas pacientes com endometriose férteis do grau de classificação I/II (n=22) foi de 40,9% AG e GG (9/22) foi de 18,2% (4/22); Já nas pacientes com endometriose inférteis do grau de classificação I/II (n=22) detectou-se 27,3% (6/22) do genótipo AG e 13,6% (3/22) do genótipo GG. Verificou-se que a frequência alélica AG das pacientes férteis com endometriose do grau de classificação

I/II foi de aproximadamente 1,5 vezes maior que as pacientes inférteis com endometriose do mesmo grau de classificação.

A frequência do genótipo do gene RE β das pacientes com endometriose férteis do grau de classificação III/IV (n=29) foi de 27,7% (8/29) AG e 10,3% (3/29) do genótipo GG; Já nas pacientes com endometriose inférteis do grau de classificação III/IV (n= 29) detectou-se 31,0% (9/29) do genótipo AG e 31,0% (9/29) do genótipo GG. Verificou-se que a frequência alélica AG nas pacientes inférteis com endometriose de classificação III/IV foi de aproximadamente 1,1 vezes maior que as pacientes férteis com endometriose da mesma classificação. Não sendo estatisticamente significante $P = 0,408$.

Tabela XI - Distribuição genotípica do polimorfismo RsaI do gene RE β nas pacientes com endometriose e subgrupos de férteis e inférteis em seus graus de classificação de vários estágios, de acordo com o número e a localização das lesões segundo *American Fertility Society*.

Grupos/Genótipos	Férteis						Inférteis				P^a		
	RsaI												
	AA		AG		GG		AA		AG			GG	
Endometriose	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Classificação	0	0	9	40,9	4	18,2	0	0	6	27,3	3	13,6	
I/II (n = 22)													0,408
III/IV (n = 29)	0	0	8	27,7	3	10,3	0	0	9	31,0	9	31,0	

^a Valor de P calculado pelo teste do χ^2

Analisou-se os hábitos sociais fumar, ingerir bebida alcoólica, uso de anticoncepcionais, e a prática de exercícios físicos e o polimorfismo RsaI do gene RE β nos grupos de pacientes com endometriose e controles.

A frequência do genótipo AG do gene RE β das pacientes do grupo com endometriose que fumam foi de 3% (1/32) e não fumam 97% (31/32) Já o genótipo GG em fumantes foi de 10% (2/20) e 90% (18/20) em não fumantes (Tabela XII). Não detectou-se neste estudo 0% (0/0) do genótipo AA; Sendo $P = 0,672$ não foi estatisticamente significante e o $OR = 0,290$. Nos controles do genótipo AG do gene RE β do grupo que fumam foi de 0% (0/3) e que não fumam foi de 100% (3/3). Já o genótipo GG em fumantes foi de 7% (3/43) e 93% (40/43) em não fumantes. A frequência genotípica do polimorfismo em estudo AG foi maior em não fumantes; não sendo estatisticamente significante $P = 0,461$. A frequência do genótipo AG do gene RE β das pacientes do grupo com endometriose que bebem foi de 6% (2/32) e não bebem 94% (30/32). Já o genótipo GG em pacientes do grupo com endometriose que bebem foi de

15% (3/20) e 85% (17/20) em pacientes do grupo com endometriose que não bebem (Tabela XIII).

Tabela XII - Distribuição genotípica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de fumar.

Grupos/Genótipos	Fumam		P^a	OR	Mín	Máx
	Sim n %	Não n %				
Endometriose						
AA	0 0	0 0				
AG	1 3,0	31 97,0	0,326	0,290	-	-
GG	2 10,0	18 90,0				
Controles						
AA	0 0	0 0				
AG	0 0	3 100	0,813	-	-	-
GG	3 7,0	40 93,0				

^a Valor de P calculado pelo teste exato de Fisher.

Sendo $P = 0,283$ não foi estatisticamente significativa e o $OR = 0,3778$ com intervalo de confiança (IC) de 95% (mínimo de 0,057 e máximo de 2,490). Nos controles do genótipo AG do gene *REβ* do grupo que bebem foi de 0% (0/3) e que não bebem foi de 100% (3/3). Já o genótipo GG em em pacientes do grupo com endometriose que bebem foi de 30% (13/43) e 70% (30/43) em pacientes que não bebem. Não sendo estatisticamente significativa $P = 0,359$.

Tabela XIII - Distribuição genotípica polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de ingerir bebida alcoólica (bebem).

Grupos/Genótipos	Bebem		P^a	OR	Mín	Máx
	Sim n %	Não n %				
Endometriose						
AA	0 0	0 0				
AG	2 6,0	30 94,0	0,283	0,3778	0,057	2,490
GG	3 15,0	17 85,0				
Controles						
AA	0 0	0 0				
AG	0 0	3 100	0,359	-	-	-
GG	13 30,0	30 70,0				

^a Valor de P calculado pelo teste exato de Fisher

A frequência do genótipo AG do gene *REβ* das pacientes do grupo com endometriose que usam anticoncepcionais foi de 22% (7/32) e que não usam 78% (25/32). Já o genótipo GG foi de 40% (8/20) em pacientes que usam anticoncepcionais e 60% (12/20) em pacientes que não usam (Tabela XIV). Sendo $P = 0,138$ não foi estatisticamente significativa e o $OR = 0,420$. Nos controles do genótipo AG do gene *REβ* que usam anticoncepcionais foi de 33,3% (1/3) e 66,7% (2/3) não usam anticoncepcionais. Já o genótipo GG em fumantes foi de 35%(15/43) em pacientes que usam anticoncepcionais e 65%(28/43) em pacientes que não

usam. A frequência genotípica do polimorfismo em estudo AG foi 2 vezes maior em pacientes que não usam anticoncepcionais que as que fazem uso; não sendo estatisticamente significante $P = 0,726$ e $OR = 0,933$ IC = 95% (0,078 a 11,157).

A frequência do genótipo AG do gene $RE\beta$ das pacientes do grupo com endometriose que praticam atividades físicas foi de 72% (23/32) e não praticam 28% (9/32). Já o genótipo GG em fumantes foi de 45% (9/20) nas pacientes que praticam atividades físicas e 55% (11/20) nas que não praticam (Tabela XV).

Tabela XIV - Distribuição genotípica polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de usar anticoncepcionais.

Grupos/Genótipos	Anticoncepcionais		P^a	OR	Mín	Max
	Sim n %	Não n %				
Endometriose						
AA	0 0	0 0				
AG	7 22,0	25 78,0	0,138	0,420	0,123	1,431
GG	8 40,0	12 60,0				
Controles						
AA	0 0	0 0				
AG	1 33,3	2 66,7	0,726	0,933	0,078	11,157
GG	15 35,0	28 65,0				

^a Valor de P calculado pelo teste exato de Fisher

Sendo $P = 0,05$ não foi estatisticamente significante e o $OR = 3,123$ IC = 95% (0,969 a 10,068). Nos controles do genótipo AG do gene $RE\beta$ do grupo que praticam atividades físicas foi de 66,7% (2/3) e que não praticam atividades físicas foi de 33,3% (1/3). Já o genótipo GG em pacientes que praticam atividades físicas foi de 65% (28/43) e 35% (15/43) não praticam. A frequência genotípica do polimorfismo em estudo AG foi 2 vezes menor em pacientes do grupo controle que não praticam atividades físicas do que nas que praticam, enquanto nas pacientes do grupo controle que praticam atividades físicas foi 2 vezes maior que em pacientes que não praticam. Não sendo estatisticamente significante $P = 0,726$ e $OR = 1,071$ IC = 95% (0,090 a 12,808).

A frequência genotípica do polimorfismo do gene $p53$ no códon 72 ($n = 20$), em pacientes com endometriose (Tabela XVI) foi de 37,7% (20/53) com Arg/Arg e 62,3% (33/53) do Arg/ Pro + Pro/Pro; Já das pacientes do grupo controle ($n = 40$), o genótipo Arg/Arg foi de 57,5% (23/40) e 42,5% (17/40) do Arg/ Pro + Pro/Pro. Obtivemos aproximadamente 2 vezes maior frequência do genótipo Arg/ Pro + Pro/Pro do que Arg/Arg no grupo com endometriose.

Tabela XV - Distribuição genotípica polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto ao hábito de praticar atividades físicas .

Grupos/Genótipos	Atividades Físicas				<i>P</i> ^a	OR	Mín	Max
	Sim		Não					
	n	%	n	%				
Endometriose								
AA	0	0	0	0				
AG	23	72,0	9	28,0	0,05	3,123	0,969	10,068
GG	9	45,0	11	55,0				
Controles								
AA	0	0	0	0				
AG	2	66,7	1	33,3	0,726	1,071	0,090	12,808
GG	28	65,0	15	35,0				

^a Valor de *P* calculado pelo teste exato de Fisher

A frequência do polimorfismo do gene *p53* com alelo Prolina (Arg/ Pro + Pro/Pro) foi 1,5 vezes maior em pacientes do grupo com endometriose do que no grupo controle, sendo estatisticamente significativa ($P= 0,04$).

Tabela XVI - Frequência genotípica do polimorfismo do gene *p53* em pacientes com endometriose e controles.

Grupos/Genótipos	<i>p53</i>				<i>P</i> ^a
	Arg/Arg		ArgPro/ ProPro		
	n	%	n	%	
Endometriose (n=53)	20	37,7	33	62,3	0,04
Controles (n=40)	23	57,5	17	42,5	

^a valor de *P* calculado pelo teste exato de Fisher

A frequência genotípica do polimorfismo do gene *p53* e o polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em pacientes com endometriose (Tabela XVII) foi de 75% (15/20) do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* com Arg/Arg e 25% (5/20) do genótipo GG para o mesmo alelo. Os genótipos Arg/Pro + Pro/Pro foi de 51,5% (17/33) do genótipo AG e 48,5% (16/33) do genótipo GG.

Detectou-se a frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* no grupo com endometriose 3 vezes maior para o alelo ArgArg do que o genótipo GG para o mesmo alelo. Já das pacientes do grupo controle (n = 40), o genótipo Arg/Arg foi de 4,3% (1/23) do genótipo AG e 95,7% (22/23) do genótipo GG. Já Arg/Pro + Pro/Pro foi de 6% (1/17) do genótipo AG e 94% (16/17) do genótipo GG.

Obtivemos aproximadamente 8,5 vezes maior frequência do genótipo Arg/ Pro + Pro/Pro no grupo com endometriose do que no grupo controle. Sendo estatisticamente significativa ($P < 0,0001$).

Tabela XVII - Frequência genotípica do gene *p53* nas pacientes dos grupos com endometriose e controle, em relação polimorfismo *RsaI* do gene *REβ*.

<i>RsaI</i>	AG		GG		<i>P</i> ^α
	n	%	n	%	
Endometriose					
Arg/Arg	15	75,0	5	25,0	
ArgPro+ ProPro	17	51,5	16	48,5	
TOTAL	32		21		
< 0,001					
Controles					
Arg /Arg	1	4,3	22	95,7	
ArgPro+ProPro	1	6,0	16	94,0	
TOTAL	2		38		

^α Valor de P calculado pelo teste do χ^2

6. DISCUSSÃO

A endometriose tem como característica a presença de implante ectópico de glândulas e/ou estroma endometrial, funcionante e sensível (Giordano, 1998). É uma doença enigmática e de etiologia não esclarecida, que incide principalmente em mulheres em idade reprodutiva. Hoje a endometriose é considerada multi-sistêmica podendo afetar vários órgãos (ovários, peritônio pélvico, tecido subcutâneo, trompas, intestino, reto sigmóide etc.) (Moura, 1999). A endometriose segundo Abrão *et al.*, 2000 está presente em pelo menos 10% da população geral e que nos grupos de pacientes com infertilidade pode chegar a 50% .

No nosso estudo realizado em mulheres com endometriose, verificou-se que a frequência alélica do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em heterozigose AG, foi aproximadamente 9 vezes maior nos casos com endometriose que nos controles. Não detectou-se a homozigose (AA) do polimorfismo em nenhuma paciente do grupo com endometriose ou controle . Nossos resultados concordam com o estudo de Sundarrajan *et al.* (2001) que relata que em mulheres chinesas com disfunções ovulatórias com a presença do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* foi significativamente maior do que em pacientes controles. Porém o genótipo em homozigose AA foi detectado no grupo de pacientes com disfunções ovulatórias e não nas pacientes do grupo controle, diferente do nosso estudo.

Os resultados de Aschim *et al.*, 2005 que analisou a frequência do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em homens, demonstraram que o heterozigoto *RsaI* AG foi 3 vezes maior em homens inférteis comparados aos controles, levando a concluir que o polimorfismo no gene *REβ* deve modular a spermatogenese humana. Seguindo a mesma linha de estudo Bordin *et al.*, 2009 relataram que em pacientes com espermogramas alterados a frequência do heterozigoto *RsaI* AG, foi 4 vezes maior que nos controles.

A literatura relacionando o gene *REβ* e a patologia foco deste trabalho (endometriose), é praticamente inexistente, o que torna nosso trabalho bastante inovador.

No levantamento bibliográfico realizado, detectou-se que no ano de 2007 surgiram trabalhos visando desvendar o papel biológico do *REβ* no endométrio e endometriose, ressaltando-se o trabalho de Qin Xue *et al.* (2007) que afirmam o papel biológico do *REβ* ainda não está esclarecido, o que o levou a escolher o estudo. Considerando as diferenças entre endométrio e endometriose e a possibilidade do uso terapêutico, os autores verificaram que a presença da expressão do *REα* é menor que o *REβ* em células estromais

endometrióticas. Nosso estudo não quantificou a expressão e também não comparou com outra isoforma, no entanto confirma a presença do polimorfismo do gene $RE\beta$ nas pacientes com endometriose.

Bukulmez *et al.* (2008) relatam que o estrogênio tem um importante papel no controle da expressão de uma grande variedade de genes e que os receptores α e β mediam os efeitos do estrogênio. Postulam que o $RE\beta$ se opõe aos processos proliferativos do $RE\alpha$ e conclui que o primeiro poderá servir como marcador de resposta inflamatória crônica tendo um papel anti inflamatório e oposto a progressão. No ano seguinte a equipe de pesquisadores chefiada por Trukhucheva (2009), relatam que elevados níveis de $RE\beta$ em células estromais devem estimular a progressão através do ciclo celular, da proliferação do tecido doente in vivo. Nos nossos resultados a presença do polimorfismo AG do gene $RE\beta$ está presente nas pacientes com endometriose de grau de classificação de acordo com as lesões (*American society*) I/II e III/IV, sendo que nas pacientes com grau I/II férteis há maior presença do polimorfismo do que nas inférteis do mesmo grau de classificação. Já nas pacientes férteis de classificação III/IV há menor presença do polimorfismo do gene $RE\beta$ do que nas pacientes inférteis da mesma classificação. Avaliamos a presença do polimorfismo AG do gene $RE\beta$ e não especificamente do gene, entretanto notamos a sua presença em qualquer nível de estadiamento da doença. Podemos afirmar que a presença de estrogênio local favorece o desenvolvimento da endometriose, já que nos estágios iniciais a frequência do polimorfismo AG é maior nas pacientes férteis do que nas inférteis.

Ao analisarmos a distribuição da frequência alélica AG do polimorfismo do gene $RE\beta$ nas pacientes com endometriose férteis detectamos uma frequência aproximadamente 10,5 vezes maior em relação ao grupo controle e nas pacientes com endometriose inférteis 8,5 vezes maior. Todavia, quando correlacionamos os subgrupos de fertilidade e infertilidade entre si, não encontramos significância estatística, apresentando assim uma associação do polimorfismo em estudo a endometriose independente do grau de fertilidade. Tempfer *et al.* (2008) relatam que o gene $RE\beta$ foi relacionado a um risco aumentado no estágio IV da endometriose em mulheres japonesas onde ao compararmos ao nosso estudo foi encontrado a presença do polimorfismo em todos os estágios de classificação da endometriose.

Embora no nosso levantamento bibliográfico não tenhamos encontrado trabalhos correlacionando a frequência do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ em pacientes com endometriose e seus subgrupos de férteis e inférteis de acordo com seus graus de classificação, o estudo de Hapanangama *et al.* (2008) afirmam que a endometriose está

associada ao decréscimo da expressão do RE β endometrial e está associada á proliferação celular e a *up* regulação da telomerase. Esta análise complexa relata que a telomerase especificamente correlaciona com a proliferação celular e que vários cânceres expressam altos níveis de telomerase. Sugere ainda que esta expressão na camada endometrial varia de acordo com as fases hormonais cíclicas nas mulheres saudáveis e que em mulheres com endometriose há um nível muito elevado no endométrio. Relatam também que estes achados foram associados ao decréscimo vascular e estromal da expressão do RE β em mulheres com endometriose.

Renner *et al.*(2006) relatam em seus estudos que, sendo a endometriose uma patologia estrogênio dependente, é possível que a variação genética na via de mediação do estrogênio viabilize uma potencialização do estrogênio facilitando a invasão e aumento da endometriose. Questiona-se que talvez por esta via de potencialização de estrogênio é que em nossos resultados nas mulheres férteis com endometriose o polimorfismo AG está em maior frequência. Bardin *et al.* (2004), em seu artigo de revisão sobre a perda de expressão do RE β em tumores estrogênio dependente, afirmam que o estrogênio induz a proliferação celular e é um passo crucial na carcinogênese dos tecidos alvo ginecológicos e seus efeitos mitogênicos em tecidos como no endométrio, pulmão e ovários.

Entretanto Collins *et al.* (2009), relatam dados sobre o papel do RE β na progressão do cancer, sobrevivência celular e proliferação. A expressão exagerada do RE β resulta em efeitos antiproliferativos e pró apoptóticos, concluindo que a ativação do gene RE β dependente pode ocorrer em câncer endometrial. Os autores pesquisaram em linhagens celulares de adenocarcinoma endometrial a presença de 3 isoformas do RE β (2, 5 e alfa) e de acordo com a diferenciação celular a expressão dos REs foi considerada mínima.

Quin Xue *et al.* (2007), afirmam que em tecidos endometrióticos humanos e células estromais há um nível elevado de RE β em relação a tecidos endometriais eutópicos. Através de biópsia o endométrio sadio e a parede do tecido endometriótico ovariano foram analisados histologicamente e retiradas as células estromais para realização da extração do RNA e RT-PCR(PCR em tempo real). A presença do RE β foi detectado maior em células estromais de tecidos endometrióticos e quase ausente em células estromais endometriais. No nosso estudo não avaliamos a expressão do RNA o que não invalida a possibilidade de estudos futuros para avaliarmos a frequência do mesmo gene, a expressão do RNA e em biópsia de tecidos endometrióticos.

Nosso estudo não demonstrou uma significância estatística do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose e grupo controle de acordo com as variáveis de hábitos sociais como o fumo, ingestão de bebida alcoólica, uso de anticoncepcionais e a prática de atividades físicas. O hábito de fumar, na análise da frequência do polimorfismo *RsaI* AG é relevante embora estatisticamente sem significância. As não fumantes apresentaram a frequência do polimorfismo AG maior do que nas pacientes com endometriose e fumantes. Estes resultados estão de acordo com a literatura onde observamos, o fumo como fator controverso no estudo da endometriose. Cramer *et al.* (1986) relatam 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. As mulheres fumantes têm uma tendência a apresentar níveis séricos de estrogênio diminuídos, o que serviria, portanto como agente protetor da endometriose; Por outro lado, Parazzini *et al.* em suas pesquisas, não encontrou diferença entre fumantes e não fumantes quanto a incidência de endometriose ovariana (Marques *et al.*, 2005). Estudos comprovam que fumantes são relativamente estrógenos deficientes, além de estarem expostos a altos níveis de dioxina e outros componentes do cigarro que tem atividade *hormônio-like* (Abdalla H *et al.*, 1998).

Quanto ao hábito de ingerir bebida alcoólica, observa-se no nosso estudo que há uma presença maior da frequência AG do polimorfismo em pacientes do grupo com endometriose e que não tem este hábito. Missmer *et al.* (2004) relatam em seus estudos de endometriose correlacionando estilo de vida, que doses moderadas de bebida alcoólica e café não estão associados com a fertilidade ou infertilidade e sim uma relação inversa e contraditória. Nos resultados de seus estudos mulheres que ingerem bebida alcoólica têm um baixo risco para endometriose. Entretanto, Martinii AC *et al.*, 2004, relatam a correlação entre o consumo de bebidas alcoólicas associado ao aumento da infertilidade de causa anovulatória e devido a endometriose e que o uso de cinco doses diárias de álcool reduziria em 40% a chance de gravidez.

Nosso estudo demonstrou que a frequência do polimorfismo em estudo em pacientes que não fazem uso de anticoncepcionais é 3,5 vezes maior do que em pacientes que fazem uso embora estatisticamente não foi significante, vem de encontro a afirmação do estudo de Ribeiro *et al.* (2009), relatam que o uso de anticoncepcionais por períodos prolongados têm o potencial de prevenir a endometriose por seu efeito bloqueador da produção de estrógenos, se constituindo numa das armas para o tratamento complementar.

Na observação da frequência genotípica AG do polimorfismo no gene RE β quanto a prática de atividade física, detectou-se uma frequência maior em pacientes que praticam do que nas que não praticam revelando uma relação inversa aos trabalhos levantados.

Analisando estes resultados quanto a prática de exercícios, observa-se o guia de orientação da FEBRASGO (Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia), onde se recomenda a prática desta atividade como uma das formas de tratamento da dismenorréia presente na endometriose. Assim como o trabalho de Petta *et al.*, (2002) afirmam que através da prática de exercícios físicos diários, há melhora do sistema imunológico da paciente e aumenta a capacidade de suportar a dor; se o sistema imunológico está saudável, o corpo elimina facilmente as células do endométrio existentes em lugares errados (coágulos ectópicos) e com uma atividade física freqüente, há inibição do estrógeno, que “alimenta” a doença.

A análise do polimorfismo do gene *p53* no códon 72 em pacientes com endometriose e controle; a frequência genotípica ArgPro+ProPro no grupo com endometriose foi 1,5 vezes maior que nas pacientes controle.

Essa diferença entre as frequências dos genótipos ArgPro+ProPro em pacientes com endometriose vão de encontro ao relatado no trabalho de Hsieh e Lin (2006) que concluíram a associação de endometriose e polimorfismo de *p53*. O alelo arginina em homozigose no códon 72 está relacionado com baixa suscetibilidade de desenvolvimento da endometriose. A presença do alelo prolina em dose dupla (PRO/PRO) ou apenas um alelo (PRO/ARG) está relacionado com suscetibilidade mais alta. No trabalho de Chang (2002) o alelo prolina estaria relacionado a uma incidência de duas a três vezes maiores de desencadear a endometriose.

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

Nosso estudo também realizou a análise da frequência genotípica do polimorfismo *p53* e sua correlação com o polimorfismo *RsaI* gene RE β e detectou uma frequência maior nos genótipos ArgPro+ProPro em pacientes com endometriose do que no grupo controle. Não há estudos semelhantes para esta correlação nos trabalhos levantados. Porém podemos afirmar que existe uma semelhança como marcadores moleculares, auxiliando no ciclo celular, atuando na proliferação celular e apoptose.

A endometriose é enigmática por sua etiologia não ser totalmente esclarecida. Nosso estudo vem colaborar com seus resultados para desvendar a análise molecular da

endometriose e sua correlação com o polimorfismo do receptor beta estrógeno. Estudos futuros poderão aprofundar e linha de pesquisa comparando nossos resultados com materiais e métodos diferentes como biópsias de tecidos endometriais (tópicos) e endometrióticos (ectópicos) somando a análise da expressão do RNAm.

7 - CONCLUSÕES

- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* foi 9 vezes maior em pacientes com endometriose do que nas pacientes controles.
- A frequência do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* do genótipo AG das pacientes com endometriose férteis foi de 1,2 vez maior do que nas pacientes inférteis.
- Verificou-se que a frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose que não fazem uso de anticoncepcionais foi 3,5 vezes maior comparado nas pacientes que fazem uso de anticoncepcionais.
- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose quanto a prática de atividade física foi estatisticamente significativa.
- A frequência genotípica AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em pacientes com endometriose férteis de classificação I/II foi 1,5 vezes maior do que em pacientes com endometriose inférteis de mesma classificação e nas pacientes inférteis de classificação III/IV foi 1 vez maior que as férteis de mesma classificação.
- A presença do alelo Arg/Arg em pacientes do grupo controle foi 1,5 vezes maior do que em pacientes com endometriose, já a presença do alelo Arg/Pro é 1,5 vezes menor nas pacientes do grupo do grupo controle em relação a pacientes com endometriose.

- A frequência AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nas pacientes com endometriose com os genótipos Arg/Pro + Pro/Pro do polimorfismo do gene p53 foi de aproximadamente 8,6 vezes maior do que no grupo controle.
- Quando a frequência AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* é correlacionada ao polimorfismo do gene p53 com os genótipos Arg/Pro + Pro/Pro, detecta-se a existência de frequência dos dois polimorfismos na endometriose .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla H, Rizk B. Fast facts endometriosis. Oxford, United Kingdom: Health Press Unlimited, 1998.

Abrão MS, Podgaec S, Dias JA, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril*. 2006;86: 543-7.

Abrão MS, Podgaec S, Martorelli Filho B. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12 (11): 2523-27.

Abrão MS. Endometriose uma visão contemporânea. Rio de Janeiro; Editora Revinter; 2000.

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

Ackerman J, Carr BR. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002; 3: 225-30.

Acosta AA, Sueldo CE. Endometriosis Infertilidad. In: Remohi J, Simon Pellicer A, Bonilla EM. *Reproducción Humana*. Madrid: McGraw Hilal Interamericana de España; 1996. p.183.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts KE, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4nd ed. New York : Garland Science; 2003; 15: 1-37.

Aldrighi TM. *Endocrinologia ginecológica, aspectos contemporâneos*. São Paulo: Ateneu; 2005. p. 221-28.

Almeida JD. Expressão do gene p53 no carcinoma bucal. *Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos* 1999 Dec 1 (1).

Almeida Filho, GL. Endometriose: tratamento clinico e cirúrgico. *Jornal Bras de Med* 1986:109-16.

Ammendola M, Bottini FG, Sesti F, Piccione E, et al. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril*.2008. 90(2): 406-08.

American Fertility Society. Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis Fertil Steril 1985; 43:351.

American Society Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine. Classification of Endometriosis 1996. Fertil Steril 1997: 817-21.

Arruda CVR. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? Clinical Genetics 1998 (54):210-14.

Arvanits DA, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Komantakis EE, Spandidos DA. Low penetrance genes are associated with increased susceptibility to endometriosis. Fertil Steril 2001; 76:1202-6.

Aschim EL, Giwercman A, Stahl O, Eberhard J, Cwikiel M, Nordenskjöld A, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman Y. The RsaI Polymorphism in the Estrogen Receptor-Gene Is Associated with Male Infertility. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(9):5343-8.

Ayala YR, Mota GM. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación (primera parte). Ginecol Obstet Mex 2007; 75 (8):477-83.

Badawy SZA, Cuenza V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC, Cobles DA - Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. Fertil. Steril., 42: 704-08, 1986.

Baranova H, Bothrishvilli R, Canis M, Albuisson E, Lowaczower E, Bruhat MA, Baranov V, Malet P. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to Endometriosis in a French population. Molecular Hum Reprod 1987;3 (9): 775-80.

Barra GB *et al.* Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia 2004 Feb ;48(1): 25-39.

Bartosik D, Jacobs SL, Kelly LJ. Endometrial tissue in peritoneal fluid. Fertil. Steril 1986;46:796-800.

Bedone AJ, Monteiro IMU, Canfour CC, Ribeiro Filho AD. Correlação entre as manifestações clínicas e os achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica. Reprodução 1994;9(4):219-21.

Bergqvist A, Ferno M, Mattson S. A comparison of cathepsin D levels D levels in endometriotic tissue and in uterine endometrium. Fertil Steril. 1996; 65: 1130- 4.

Bordin BM. A associação entre o polimorfismo RsaI do gene receptor β de estrógeno com a infertilidade masculina [Dissertação].Goiânia: Universidade Católica de Goiás; 2009.75 p.

Brosens I. Endometriosis:ovarian endometriosis. Tubal Infertility. London:Gower Medical Publishing ; 1989. 313-7.

Brosens I, Wamsteker K. Diagnostic imaging and endoscopy in gynecology. London:Saunders. London; 1997. 228-42.

Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H, Utsunomiya H, Yin P, Luo X, Lin Z, Imir G, Thung S, Su EJ, Kim JJ Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. Semin Reprod Med 2010Jan; 28(1):36-43.

Carvalho CV, D' Amota P, Sato H, Girão MJBC, Lima GR, Silva IDG, Schor E. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose pélvica. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 2004; 26(8): 613-17.

Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents DNA adducts and mutations; J Natl Cancer Inst Monogr 2000; (27):75-93.

Chatman DL. Endometriosis in the black woman. Am J Obst.Gynecol 1976;125(7): 987-89.

Chlebowski RT, Aiello E, Mctiernan A. Weight loss in breast cancer patient management. J Clin Oncol 2002; 20:1128-43.

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD. Estrogen plus progestin influence on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: The women's health initiative randomized trial. JAMA 2003; 289:3243-53.

Clarke CL, Sutherland RL. Progestin regulation of cellular proliferation. Endocr Ver 1990;11(2): 266-301.

Collins F, Mcpherson S, Brown P, Bombail V, Williams RWA, Anderson AR, Jabour NH, Sauders TKP. Expression of oestrogen receptors, ER α , ER β , and ER β variants, in endometrial cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ER α . 2009 ; 2430-9.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. Cancer Res 2003; 63:5236-38.

Dmowuski WP, Lesniewicz R, Rana N, Pepping MP. Changing trends in the diagnosis of endometriosis: a comparative study of women with pelvic. *Fertil Steril* 1987 Feb 67(2): 238-43.

Donaldson CJ, Crapanzano JP, Watson JC, Levine EA, Batzer MA. PROGENS Alu insertion and human genomic diversity. *Mutat* 2002; 501:137- 41.

Donnez J, Nissole M, Karaman Y, Wayenbergh M, Bourgonjon D, Clerckx F, Casanas-Roux F. CO2 laser laparoscopy in peritoneal endometriosis and in ovarian endometrial cyst. *J Gynecol Surgery* 1989; 5: 361- 66.

Donnez J, Casanas-Roux F, Nissole M. Peritoneal endometriosis: new histopathological aspects. In Broersens J, Donnez J. The current status of endometriosis. *Fertil Steril* 1993;59(3):681-4.

Donnez J, Nissole M, Smoes P, Gillet N, Beguin S, Casanaroux F. Peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril* 1996; (3): 362- 68.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P And Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; 127(19):4277-91.

Dvorak HF, Kaplan A, Clark R. Potential functions of the clotting system in wound repair. In: Clark RAF, Henson PM. (eds.). *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York:Plenum Press; 1988. p 57–86.

Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB And Korach KS Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996;137(11):4796-805.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Langercrantz S, Langercrantz J, Fried G, Nordenskjo M, Gustafsson JA. Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82(12).

Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. *Manual de Orientação da Endometriose*. São Paulo: FEBRASGO; 2007.

Fedelle, L, Anchi S, Boccioloni, L. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79: 767-9.

Ferreira Ferreira, ME, Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3rd ed. Brasília: Embrapa-Cenargen,1998.

Franco, J. Fisiologia do Desenvolvimento e maturação folicular natural. Centro de Reprodução Humana. Em: <<http://www.crh.com.br>> acesso em outubro de 2009.

Galiano D. Polimorfismos genéticos de la ruta estrogenica que influyen en la duración de la ventana fértil de la mujer. [Tese].Facultad de Medicina de Granada (ES);2009. 231.

Ganong WF. Fisiologia Médica. Mc Graw Hill. Rj. 2000; 23: 315-24.

Gennari L, Merlotti D. De Paola V, Calabrò A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen Receptor Gene Polymorphisms and the Genetics of Osteoporosis: A Huge Review. American Journal of Epidemiology 2005;161(4):307- 20.

Giordano MG. Ginecologia endócrina e da reprodução. 1.ed. São Paulo: BYK; 1998. p.225-44.

Greenhill, JP, Freed SC: The electrolyte therapy of premenstrual distress. *J Am Med Assoc* **1941**: 119:504.

Guembarovski RL, De syllos Cólus IM. Glutathione s-transferase M1 (GSTM1): distribuição étnica e relação com o câncer. Semina: Ci Biol Saúde (Londrina) 2001 Jan./Dec 22:3-9

Gustafsson, J A. Seeking ligands for lonely orphan receptors. Science 1999; 284:1285 -86.

Guyton ACG, Hall JEH. Tratado de fisiologia médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006.

Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. Hum Reprod 1996; 11:878–80.

Halme J, Hammond MG, Hulka JF. Incidence of retrograde menstruation in healthy women and patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984;64:151.

Hapangama DK, Turner MA, Druy S, Quenby G, Saratzki C, Martin-Ruiz, Zglinicki TV Endometriosis is associated with aberrant endometrial expression of telomerase and increased telomere length. Human Reproduction 2008;23(7):1511-1519.

Hasson, HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med* 1976;16: 135-38.

Hess RA, Bunick D, Lee Kh, Bahr J, Taylor JA, Korach KS And Lubahn DB. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997;390(6659):509-12.

Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS And Greene GL Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl* 1997;18(6):602-11.

Hess RA, Nakai M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol Histopathol* 2000;15(1):207-24.

Heuvel JV. Índigo Biosciences Inc, The Nuclear Receptor Company; em: nrresouce.org/html< jackvh.cas.psu.edu> acesso em dezembro de 2009.

Hong Y C; Lee KH; Yi CH; Há EH; Christiani DC. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. *Toxicol Lett* 2002; 129:255-62.

Hsieh YY, Lin CS. P53 codon 11, 72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. *Int J Biol Sci.*2006; 2(4): 188-93.

Kaupilla A. Changing concepts of medical treatment of endometriosis. *Acta Obstet. Gynecol Scand* 1993;72:324- 36.

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

Kirshon B, Poindexter AN, Fast J. Endometriosis in multiparous women. *J Reprod Med* 1989; 34:215-17.

Klumb CE, Júnior GBC. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev. Brasil de Hematol/Hemot* 2002; 24(2):111-25.

Koninckx PR. The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil. Steril* 1992;58:290- 95.

Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, de Ronde IJ, Jap PH, Rolland R. Endometrial

epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 1991; 55:297-303.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S And Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12):5925-30.

Kurz C, Tempfer, CB, Boeskoer S, Unfried G, Nagele F, Hefler LA. The PROGINS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8:295-8.

Kwok PY., Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Molecular Medicine Today* 1999;5: 538-43.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host. antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1976;278:261-3.

Lecke SB. Expressão gênica do bcl2, receptor de estradiol e receptores de progesterone A e B em endométrio eutópico e ectópico de pacientes inférteis sem e com endometriose. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul, 2006.

Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J, Bunick D. Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod* 2000; 63(3):1873-80.

Levanat S, Kappler R, Hemmerle B, Doring P, Musani, V, Komar A, Orešković S, Pavelić B, Hahn H. Analysis of alterations of the PTCH1 signaling pathway in ovarian dermoids. *International Journal of Molecular Medicine* 2004; (4):793-99.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-56.

Linhares JJ, Nogueira NC, Noronha EC, Ferraro O, Baracat, Fausto F, Polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controle. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(8).

Lubahn DB, Mover J S, Golding TS, Couse JF, Korach KS. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 94, 1997.1478.

Mclaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11: 220-223.

Mafrá FA, Rosset VF, Galvão F, Gimenes C, Christofolini D, Bianco B, Barbosa CP. Avaliação genético-clínica na determinação dos fatores de risco para endometriose correlacionados à infertilidade em mulheres portadoras de endometriose. In: Anais 54º Congresso Brasileiro De Genética; 2008. São Paulo: Faculdade de Medicina do ABC; 2008.

Marques, RM. Endometriose e infertilidade:revisão sistemática da literatura e relato de *casos* [Monografia]. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis; 2005. 112.

Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Cannis M, Sasano H, Okamura K. Expressão do receptor de estrogênio α e β na endometriose e peritoneal e ovariana. *Fert Steril* 2001; 75: 1198-205.

Martini AC. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fert Steril* 2004; 82(2):374-77.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;16:1215.

Minguez Y, Rubio C, Bernal A, et al. The impact of endometriosis in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection because of male infertility. *Hum Reprod* 1997; 12:2282-5.

Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, et al. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet Gynecol* 2004;104:965-74.

Miyazawa K. Incidence of endometriosis among japanese women. *Obstet Gynecol* 1976; 48:407-9.

Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 1993;72:560-4.

Moen MH, Magnus P. Endometriosis in monozygotic twins. *J Assist Reprod Genet* 1995.

Moore JT, Mckee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM And Willson TM, Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247(1):75-8.

Moore LK, Dalley FA. Órgãos Genitais Femininos.Ed. Koogan. 2001; 327-34.

Moreira MA. Fisiologia da Reprodução. Compendio de reprodução humana. Rio de Janeiro: Revinter;2002. p.160-210.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392(1):49-53.

Moura MD, Pereira TN, Ferriani RA, Sala RMR. Avaliação do tratamento clínico da endometriose. Clinical Treatment Evaluation of Endometriosis. *Rev Brasil Ginecol e Obste* 1999;21(2).

Mulac-Jericevic B, Mullinax RA; De Mayo FJ, Lydon; Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000; 289:1751-4.

Nakai M, Bouma J, Nie R, Zhou Q, Carnes K, Lubahn DB, Hess RA. Morphological analysis of endocytosis in efferent ductules of estrogen receptor-alpha knockout male mouse. *Anat Rec* 2001; 263(1):10-8.

Nakata LC; Bertollo EMC; Dos Santos I; Oliani A H; Vaz, DCM, Oliveira G H, Bertelli EC. Pavarino; Biomarcadores de Suscetibilidade à Endometriosis. *Rev Brasil Ginecol e Obste* 2004;.26(4).

Nakata LC, Bertollo EMG, Santos I, Oluani AH, Vaz DCM, Oliveira GH, Bertelli ECP. Biomarcadores de suscetibilidade à endometriose. *Rev Brasil Ginecol e Obste* 2004;.23(4).

Nezhat, C, Nezhat, F, Silfen, SL. et al. Laparoscopic myomectomy. *Int J Fertil* 1991; 36: 275-80.

Nezhat CR, Burrell MO, Nezhat FR. Laparoscopic radical hysterectomy with paraaortic and pelvic node dissection. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:864-65.

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

Nisolle M. Ovarian endometriosis and peritoneal endometriosis: are they different entities from a fertility perspective? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2002;14:283- 88.

Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;(22):12887-92.

Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993;328: 1759-69.

Oliveira CA, Carnes K, França LR, Hess RA. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod* 2001;65(3):913-20.

Oliveira CA, Zhou Q, Carnes K, Nie R, Kuehl DE, Jackson GL, Franca LR, Nakai M, Hess RA. ER function in the adult male rat: short- and long term effects of the antiestrogen ICI 162,780 on the testis and efferent ductules, without changes in Testosterone. *Endocrinology* 2002;143(6):2399-409.

Pal L, Shifren JL, Isaacson KB, Chang Y, Leykin L, Toth TL. Impact of varying stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:27-31.

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

Pasternak JJ. Uma introdução à Genética Molecular Humana. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan ;2007. p. 110. 2007.

Pavao M, Traish AM. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 2001; 66(1):1-16.

Podgaec S, Abrão MS, Dias JA, Rizzo LV, Oliveira RM, Bacarat EC. Endometriosis: An inflammatory disease with Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007;22:1373-9.

Prado FC, Ramos JA. Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento. 19.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

Pritts EA, Taylor RN. An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32:653-67.

Qing X. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium endometriosis. *Biology of Reproduction* 2007; 77: 681-87.

Ranney B. Endometriosis IV. Hereditary tendency. *Obstet. Gynecol.*, 1971; 37:734-37.

Reich H, McGlynn F, Salvat J. Laparoscopic treatment of cul-de-sac obliteration secondary to retrocervical deep fibrotic endometriosis. *J Reprod Med* 1991;36:516-22.

Renner SP, Strick R, Oppelt P, Fasching PA, Engel S, Baumann R, Beckmann MW, Strissel PL. Evaluation of clinical parameters and estrogen receptor alpha gen polymorphisms for patients with endometriosis. *Reproduction and Fertility* 2006; 131: 153– 61.

Ribeiro Júnior CL. Análise do polimorfismo do Gen P53 em pacientes com endometriose e clínica associada a infertilidade. [Dissertação]. Universidade Católica de Goiás; Goiânia; 2009.70.

Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, Feng W, Kushner PJ, Nilsson S, Scalan TS, West BL, Fletterick RJ, Baxter JD. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65:133-41.

Rizner LT. Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*.2009; 307: 8-18

Rivoire WA. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Cancer* 2001; 47(2): 179-84.

Rock JA, Zacur HA, Dlugi AM, Jones HW Jr, TeLinde RW. Pregnancy success following surgical correction of imperforate hymen and complete transverse vaginal septum. *Obstet Gynecol* 1982;59:448-51.

Rodrigues DLG, Baracat EC. Ginecologia endócrina. São Paulo: Atheneu;1995.

Rossit A; Conforti FNDDT. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Soc Bras Cancerol* 2000; 3: 26-30.

Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ. Ovarian carcinoma-associated taqui restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res* 1995;55:2743-5.

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

Sampson JA. Perforating hemorrhagic cysts of the ovary, their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type. *ArchSurg*. 19

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

Silberstein T. Complications of menstruation; abnormal uterine bleeding. In: Decherney, A, Nathan, L. *Current Obstetric & Gynecologic. Diagnosis & Treatment*. 9nd ed. Los Angeles: McGraw Hill;2002. p. 623-32.

Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Cantos B, Rodrigues R, Larrondo Provencio M, España P, Bonilla F. Concomitant expression of p16ink4a and p14arf in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *The Journal of Pathology*. 2003;199:289- 97.

Smuc T, Hevir N, Pucelj M, Husen B, Thole H, Rizner LT. Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 301: 59-64.

Sneige N; Liu B; Yin G; Gong Y; Arun B K. Correlation of cytologic findings and chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in breast fine-needle aspiration specimens from women at high risk for breast cancer. *Modern Pathology*, 2006. 19: 622–29.

Speroff L. Regulation of the menstrual cycle. In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 6nd ed. Baltimore:Lippincott/Williams & Wilkins; 1999. p.201- 45.

Storey *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma virus-associated cancer. *Nature*. 1998; 393:229-34.

Sundarrajan C, Liao Wx, Ashim Cr, Soon Cng. Association between estrogen receptor-b gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.2009 ; 86(1).

Takayama K, Zeitoun K, Gunby RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of severe postmenopausal endometriosis with an aromatase inhibitor. *Fertil Steril* 1998; 69:709-13.

Tempfer CB; Simoni M; Destenaves B; Fauser BCJM. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II endometriosis *Human Reproduction Update* 2009. 15(1) 97–118.

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

Tindall VR. *Tratado de Ginecologia*.12. ed. São Paulo:Roca; 1987. 253-4.

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol* 1997;11(3):353-65.

Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM. Genetic influences on endometriosis in a Australian twin sample. *Fertil and Steril* 1999 April 71(4).

Trukhacheva E. Estrogen receptor β regulation estrogen receptor α expression in stromal cells derived from ovarian endometriosis. *J Clin Endocr Metab* 2009; 94 (2): 615-22.

Trukhacheva E, Zhihong L, Reierstad S, Cheng You-Hong, Milad M, Bulun SE. Estrogen Receptor (ER) β Regulates ER α Expression in Stromal Cells Derived from Ovarian Endometriosis *J Clin Endocr Metab* 2009 February 94(2): 615– 22.

Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat poly-morphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 1998; 43: 73-74.

Ulcova-Gallova Z, Bouse V, Svabek L, Turek J, Rokyta Z. Endometriosis in reproductiveimmunology. *Am J of Reprod Immunol* 2001; 47:269-74.

UNIFESP Ensino.Disponivel em: < www.unifesp.br.> acesso em: dezembro de 2009.

Valadares JC, Ferreira LV, Filho HC, Silva MAR. Transtorno disfórico pré-menstrual, conceito, histórica, epidemiologia e etiologia. *Rev Psiquiatr Clin* 2006; 33(3).

Vercellini P, Trespidi L, Degiorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996; 65:299-304.

Velebil P, Wingo PA, Xia Z, Wilcox LS, Peterson HB. Rate of Hospitalization for Gynecologic Disorders Among Reproductive-Age Women in the United States; *Obstet. Gynecol* 1995;86(5): 764-69.

Vigano P, Vercellini P, Di Blasio Am, Colombo A, Candiani Gb, Vignali M. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1991; 56: 894-99.

Warnmark A, E. Treuter. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation." *Mol Endocrinol* 2003; 17(10): 1901-9.

Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis – associated infertility. *J Reprod. Med* 1989;34: 41-6.

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

Wu Y. B. Xu. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 2001; 276(6): 3929-36.

Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:203–232.

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

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

Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL. Environmental toxins and endometriosis. *Gynecol Obstet* 1997; 24: 307–29.

Zhao Y, Kreger DO, Brannian JD. Serum leptin concentrations in women during gonadotropin stimulation cycles. *J Reprod Med* 2000 Feb 45(2):121-125.

Zhou Y, Morais-Cabral A, Kaufman A, McKinnon R. Química de coordenação de íons e hidratação nos canais de potássio. *Nature*, 2001; 414:43-8.

ANEXO I

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Análise do polimorfismo do gene receptor beta estrógeno (RE β) em pacientes com endometriose associado à infertilidade.

Coordenador Responsável: Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Telefones para contatos: 39467-1385 e 3946-1442

Eu abaixo qualificado, após ter sido esclarecido verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: **Análise do polimorfismo RsaI do gene receptor beta estrógeno (RE β) em mulheres com endometriose** realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás.

DECLARO assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente que o trabalho consiste na análise molecular de amostras de sangue, e resposta de um questionário, e que o mesmo será utilizados em exames correlacionados mantendo o objetivo de complementar o meu diagnóstico e de pesquisa. **Vamos coletar 15ml de sangue venoso, e este material será utilizado para analisar diferentes genes associados a endometriose para identificarmos um candidato a diagnóstico precoce de endometriose .**

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

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

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

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

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

- Nome do pesquisador: _____
- Assinatura do paciente: _____
- Data: ____/____/____

ANEXO II

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG: _____, CPF: _____, nº de prontuário: _____, nº de matrícula: _____, abaixo assinado, concordo em participar no projeto: **Análise do polimorfismo *RsaI* do gene receptor beta estrógeno em mulheres com endometriose** como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data: _____

Pesquisador: _____

Nome do sujeito ou responsável: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

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

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Observações complementares:

