



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DA COSTA E SILVA

**ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DO GENE DA
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA
ENDOMETRIOSE**

Orientador: Lídia Andreu Guillo
Co-orientador: Kátia Karina Verolli

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva

Título do trabalho:

ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA DO ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA ENDOMETRIOSE

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 15 / 03 / 17

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

RITA DE CÁSSIA PEREIRA DA COSTA E SILVA

**ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DO GENE DA
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA
ENDOMETRIOSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Lídia Andreu Guillo
Co-orientador: Kátia Karina Verolli

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pereira da Costa e Silva, Rita de Cássia
ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DO GENE DA
ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA
ENDOMETRIOSE [manuscrito] / Rita de Cássia Pereira da Costa e
Silva. - 2017.
DXXXVIII, 88 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. LIDIA ANDREU GUILLO; co-orientadora
Dra. KÁTIA KARINA VEROLLI DE OLIVEIRA MOURA.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de
Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. ENDOMETRIOSE. 2. eNOS. 3. INFERTILIDADE. I. ANDREU
GUILLO, LIDIA , orient. II. Título.

CDU 575

Ata da Defesa de Tese de Doutorado realizada por Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva. Aos quatorze dias do mês de março do ano de 2017, às 15:00 horas, reuniu-se na Sala de Leitura-IPTESP/UFG a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: "Análise molecular do polimorfismo do gene da enzima sintase endotelial do óxido nítrico na endometriose", como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Doutora, área de concentração Dinâmica do Processo Saúde-Doença. A Presidente da Comissão julgadora, Profa. Dra. Lídia Andreu Guillo, iniciando os trabalhos concedeu a palavra a candidata, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Lídia Andreu Guillo - Presidente
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis - Membro
Profa. Dra. Maria Alves Barbosa - Membro
Profa. Dra. Lee Chen Chen - Membro
Profa. Dra. Débora Pereira Santana Ramos - Membro
Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente - Membro
Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira da Moura - Suplente

Aprovado(a)/Reprovado(a)

Aprovado
APROVADA
Aprovada
aprovada
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva Habilitada (X) Não habilitada (). Nada mais havendo a tratar, eu Profa. Dra. Lídia Andreu Guillo, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura

Profa. Dra. Lídia Andreu Guillo - Presidente
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis - Membro
Profa. Dra. Maria Alves Barbosa - Membro
Profa. Dra. Lee Chen Chen - Membro
Profa. Dra. Débora Pereira Santana Ramos - Membro
Prof. Dr. Sérgio Henrique Nascente - Membro
Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira da Moura - Suplente

Lidia Andreu Guillo
Paulo Roberto de Melo Reis
Maria Alves Barbosa
Lee Chen Chen
Debora Pereira Santana Ramos
Sergio Henrique Nascente
Katia Karina Verolli de Oliveira da Moura

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

ANÁLISE MOLECULAR DO POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA ENDOMETRIOSE


Discente: Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno(a): Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva

Orientador(a): Lídia Andreu Guillo

Co-Orientador(a): Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Membros:

1. Lídia Andreu Guillo

2. Paulo Roberto de Melo Reis

3. Sergio Henrique Nascente

4. Lee ChenChen

5. Debora Pereira Santana

OU

6. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Data: 14 /03/17

Dedico este trabalho... à meus pais Jônathas Pereira da Costa e Marina Gomes da Costa (in memorian), que são minha referência na arte de ser aprendiz na grande escola da vida !

Ao meu marido, amigo, companheiro e o amor de minha vida – Clemar, pessoa mais doce que já conheci, e que dia a dia me mostra a simplicidade e leveza da generosidade conjugal!

E com a mesma importância e grandeza do amor que nos une, **aos nossos filhos: Gabriela e Jônathas Levy,** tesouros enviados por Deus que nos apoiam e embarcam em todas as “viagens” que propomos, e nos transmitem amor, respeito e lealdade!

Aos meus irmãos, de sangue e de coração, Daniel, Isaias, Alzira, Juarez, Selma, Mariana, Elzeni e Nelci pelo incentivo e companheirismo nesta jornada, como também aos cunhados (as) em especial ao Amigão **WALEÇON** (in memorian) que mesmo sem poder falar, demonstrou emoção na minha possível conquista! E a....

Todos os profissionais de saúde que diariamente trabalham com o objetivo de minimizar a dor, acabar com a doença e salvar vidas humanas!

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização desse trabalho.

À Deus, por me sustentar nos momentos difíceis, me fortalecer para superação e ser a luz nos meus pés quando sentia perdida. Agradeço também pelo dom da vida e do trabalho onde com sabedoria e discernimento me instrumentalizou para cumprir as lutas com responsabilidade.

À Dra. Lídia Guillo, que acreditou nesta aluna que já não tem a mesma idade que suas alunas de graduação, e que postergou ao máximo esse momento, pela sua atenção, compreensão, disposição na orientação desta tese e na transmissão de seus conhecimentos.

À amiga, Dra. Kátia Karina Verolli Moura, colega e profissional de uma ética incontestável, sábia e incrivelmente prática, que me acolhe sempre em minhas dúvidas e em projetos compartilhados; sempre colocando seu conhecimento a meu dispor, me orientou no curso de mestrado e hoje co orientou nesse trabalho e pela dedicação, paciência e apoio incondicional – Obrigada!

À Universidade Federal de Goiás, à Coordenação e suas secretárias, aos colegas da Faculdade de Medicina no curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde; como também aos colaboradores e equipe do laboratório de biologia molecular e bioquímica da UFG onde, sob a batuta da

Dra. Lídia fui recebida com carinho e pude realizar os ensaios com segurança e qualidade.

Ao Conselho Diretor do Hospital das Clínicas/UFG e a Coordenação na Gestão de Pessoas que apoiou este projeto e concedeu a minha licença, afim de que pudesse cumprir todos os objetivos propostos pela pós-graduação, nas pessoas da Enfa. Msc. Alexandrina Maria Nogueira Guerra, Enfa. Sônia Lúcia de Carvalho e Dr. José Garcia Neto.

A Pontifícia Universidade Católica de Goiás, aos colegas do Laboratório Replicon, que atenciosamente armazenaram as amostras de forma adequada e compartilharam momentos de discussões técnicas que colaboraram para realização desse estudo.

Não poderia deixar de agradecer aos amigos que foram presentes nesta caminhada e que trouxeram seu carinho para amenizar a fadiga – Zélia Brito, Eliamar Fleury, Marisa Ramos, Iasmim Costa, Ariane Frare, Ribeiro Júnior, Magda Lagares e Débora Marcelino. Amigos não esmoreçam, nunca é tarde para o aprendizado!

Às pacientes que consentiram a realização deste, o meu respeito e muito obrigada!

SUMÁRIO

	Figuras e tabelas	ix
	Simbolos, siglas e abreviaturas	xi
	Resumo	xiv
	Abstract	xv
1	Introdução	1
2	Revisão da literatura	4
2.1	Histórico	4
2.2	Epidemiologia	6
2.2.1	Endometriose e idade	7
2.2.2	Hábitos sociais	8
2.3	História familiar	9
2.4	Endometriose e diagnóstico	10
2.5	Endometriose e infertilidade	13
2.6	Fatores genéticos e endometriose	15
2.7	Estresse oxidativo	19
2.7.1	Espécies reativas de nitrogênio	20
2.7.2	Óxido nítrico e endométrio	21
2.8	Polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i>	26
3.0	Objetivos	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4.0	Métodos	31

4.1	Tipo de pesquisa	31
4.2	Projeto e amostras	31
4.3	Extração e quantificação	32
4.4	Critérios de inclusão	32
4.4.1	Critérios de exclusão	32
4.5	Análise do polimorfismo	33
4.6	Análise estatística	35
5.0	Resultados	36
5.1	Características gerais	36
5.2	Análise genotípica do polimorfismo	39
6.0	Discussão	47
7.0	Conclusões	58
8.0	Considerações finais	59
9.0	Referências	60
Apêndice 1	Apresentação de tabelas	69
Apêndice 2	Questionário	75
Anexo 1	Parecer do Comitê de ética	77
Anexo 2	Termo de consentimento livre e esclarecido	78
Anexo 3	Anamnese	81
Anexo 4	Normas de publicação dos periódicos	82

FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Lesões enrugadas pretas foram descritas uma mistura difusa de fibrose, como "clássico" e "típico".	1
Figura 2	Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO) sob o estímulo do <i>Shear stress</i> .	21
Figura 3	Esquema ilustrativo do cromossomo 7	29
Figura 4	Foto do gel de agarose	35
Quadro 1	Protocolo para amplificação do polimorfismo Glu298 do gene eNOS (Glu298 variante G, Glu298 variante T).	33
Quadro 2	Protocolo de termociclagem para amplificação dos <i>primers</i> do polimorfismo Glu298 do gene eNOS para as variantes G e T.	33
Quadro 3	Protocolo de digestão para amplificação dos fragmentos de DNA do polimorfismo Glu298 do gene eNOS.	34
Tabela 1	Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i> nas amostras de pacientes com endometriose em Goiânia, Goiás. 2016.	43
Tabela 2	Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i> nas amostras de pacientes com endometriose nos subgrupos férteis e inférteis em Goiânia, Goiás. 2016.	44
Tabela3	Distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>eNOS</i> nas pacientes com endometriose nos subgrupos férteis e inférteis em Goiânia, Goiás. 2016.	44
Tabela 4	Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene <i>eNOS</i> nas amostras de pacientes com endometriose de acordo com auto declaração de cor da pele em Goiânia, Goiás. 2016.	45

Tabela 5 Distribuição da análise da frequência genotípica (dominante, codominante e recessivo) nas amostras de pacientes com endometriose de acordo com o polimorfismo G894T (Glu298) do gene eNOS, em Goiânia, Goiás. 2016.

46

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACHO/ACO	Contraceptivos hormonais orais/ Contraceptivos orais
AFP	Alfa feto proteína
AFS	<i>American fertility society</i>
β 2MG	β2 microglobulina
CEA	Antígeno carcino embrionário
Co-Hesc	Células endometriais estromais ectópicas
CYP	Citocromo P450
EDTA	Etilenodiaminotetracético
eNOS	Enzima endotelial sintase de óxido nítrico
ERK	Extracellular regulated kinase
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Eu-Hesc	Células endometriais estromais eutópicas
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FEBRASGO	Federação Brasileira de Ginecologia

e Obstetrícia

FMN	Flavina Mononucleotídeo
FSH	Hormônio folículo estimulante
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
GWASs	<i>Genome Wide Association</i> - Genomas baseados na população
HNF1β	Fator Hepático Nuclear Beta1
HC – FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
IL	Interleucinas
LH	Hormônio luteinizante
MAP	Mitógeno proteína kinase ativado
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide fosfate</i>
NAT	N - acetil transferase
NO	Óxido nítrico
NOS1	Óxido nítrico sintase isoforma1
NOS2	Óxido nítrico isoforma 2
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PUC	Pontifícia Universidade Católica
RAF	<i>Protein tyrosine receptor protein</i>

kinase

RAS	Família de proteínas oncogenes
Rho A	Gene que codifica GTPases
Rock II	Proteína cinase associada <i>coiled coil cinase 2</i>
SBE	Sociedade Brasileira de Endometriose
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
Th1	Linfócitos T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócitos T <i>helper 2</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VDS	Sistema de vídeo documentação

RESUMO

A endometriose é definida pelo aparecimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais idênticas às da cavidade uterina em outras localizações, que não o endométrio e incide principalmente em mulheres em idade reprodutiva. Está presente em 10% da população geral e em 50% dos casos de infertilidade, apresentando um forte componente genético correlacionando a doença com diversos polimorfismos. Um deles, G894T do gene *eNOS* da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tem sido estudado por ter implicações com a infertilidade. O presente estudo analisou a frequência alélica e genotípica desse polimorfismo, em mulheres com endometriose estratificadas em férteis e inférteis. Foram utilizadas amostras de sangue de 47 mulheres com endometriose provenientes de um centro de referência em videolaparoscopia e infertilidade na cidade de Goiânia, Goiás. O DNA foi extraído e quantificado para a análise genotípica (PCR/RFLP) com primers e controles para ampliar o gene *eNOS* G894T. Na análise estatística foram utilizados os testes qui quadrado e/ou exato de Fisher e teste t Student. As pacientes apresentaram média de idade $33,3 \pm 2,9$ anos. As férteis apresentaram média de $34,0 \pm 2,5$ anos, enquanto as inférteis $32,7 \pm 2,3$ anos. As frequências genotípicas do polimorfismo em estudo foram: GG 59,6%, GT 29,8% e TT 10,6%; ao dividir em subgrupos de férteis e inférteis encontrou-se respectivamente: GG 70% e 50%; GT 30% e 29,2%; TT foi nulo entre as férteis e 20,8% nas inférteis. A frequência alélica entre as férteis e inférteis, foi, respectivamente: G 85% e T 15%; G 64,6% e T 35,4%, $p = 0,04$ (OR = 3,0 IC 95% 1,12 – 8,29). Na análise dos modelos de herança genotípica, codominante e recessivo as frequências observadas foram respectivamente: (GG vs. TT) 59,6% (28/47) vs 10,6% (5/47) $p = 0,044$ e recessivo (TT vs. GT +GG) foi de 10,6% (5/47) vs 89,4% (42%) $p = 0,049$. O estudo demonstrou que a presença do alelo T do polimorfismo G894T do gene *eNOS* da enzima do óxido nítrico sintase endotelial em pacientes férteis e inférteis tem um importante papel no agravamento da endometriose e em homozigose o alelo T confere risco para infertilidade na endometriose em mulheres na cidade de Goiânia - Goiás.

Palavras chave: endometriose, eNOS e infertilidade

ABSTRACT

Endometriosis is defined by the emergence of foci of endometrial tissue with glandular and stromal characteristics identical to those of the uterine cavity in other locations than the endometrium and focuses primarily on women of reproductive age. It is present in 10% of the general population and in 50% of cases of infertility, showing a strong genetic component by correlating the disease with various polymorphisms. One of them, G894T of eNOS gene of the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has been studied by have implications with infertility. The present study examined the allele frequency and genotype of this polymorphism in women with endometriosis storied in fertile and infertile. Blood samples were used 47 women with endometriosis from a center of reference in laparoscopy and infertility of the city of Goiânia, Goiás. The DNA was extracted and measured for genotypic analysis (PCR/RFLP) with primers and controls to enlarge the gene eNOS G894T. In the statistical analysis we used the Chi square tests and/or exact of the Fisher and teste t Student. The patients had an average age $33,3 \pm 2,9$ years. Fertile was demonstrated $34,0 \pm 2,5$ years, and infertile $32,7 \pm 2,3$ years. Genotype polymorphism frequencies in study were: GG 59.6% 29.8% and GT TT 10.6%; to split into sub-groups of fertile and infertile met respectively: 70% and 50% GG; GT 30% and 29.2%; TT was null between fertile and infertile 20.8%. The allele frequency between the fertile and infertile, was, respectively: G 85% and 15% T; G 64.6% and 35.4% T, $p = 0.04$ (95% CI 3.0 OR = 1.12-8.29). In the frequency analysis of genotypic heritage models, codominant and recessive were respectively: (GG vs. TT) 59.6% (28/47) vs. 10.6% (5/47) $p = 0.044$ and recessive (TT vs. GT + GG) was 10.6% (5/47) vs. 89.4% (42%) $p = 0.049$. The study showed that the presence of the T allele of eNOS gene G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase enzyme in fertile and infertile patients have an important role in the increase of endometriosis and in homozygous T allele confers risk for the infertility in endometriosis in women in the city of Goiânia-Goiás.

Keywords: endometriosis, eNOS, infertility

1 INTRODUÇÃO

A publicação clássica de Giordano (1998) define a endometriose 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. Esses focos de tecido geralmente são funcionantes e sensíveis à ação de hormônios (SILVA et al., 2011). É uma doença estrogênio dependente, de diagnóstico histológico, devendo o mesmo confirmar as suspeitas clínicas e os achados macroscópicos encontrados em cirurgias (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2009)(Figura 1). Afeta 10% das mulheres em idade reprodutiva, associada a dor pélvica, dismenorreias e infertilidade.

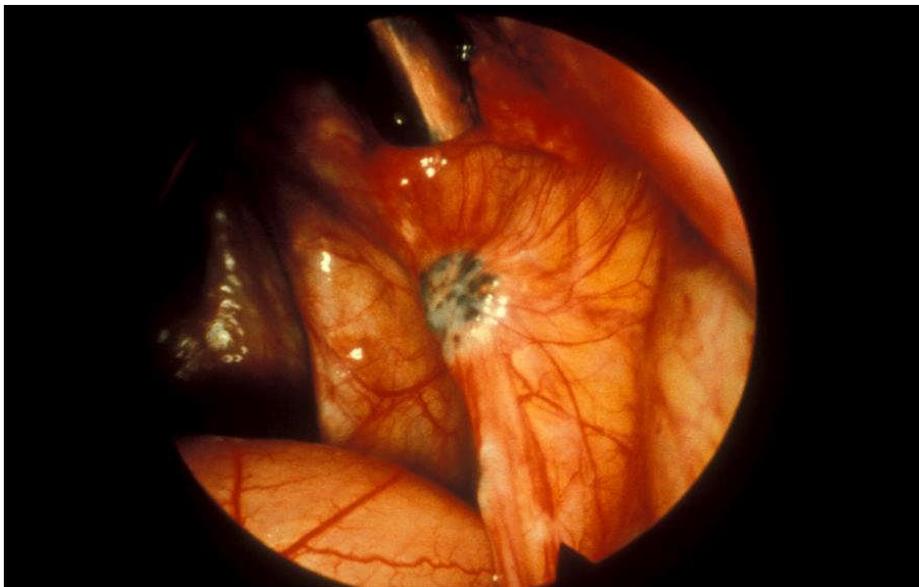


Figura 1- Lesões enrugadas pretas foram descritas uma mistura difusa de fibrose, como "clássico" e "típico." (Fonte:Ribeiro Júnior *et. al.*, 2009).

Sua etiologia continua sendo um enigma e acredita-se que a prevalência seja mais alta, já que nem sempre é diagnosticada, e a

manifestação clínica é heterogênea (MINICI et al, 2008; PERINI et al., 2014). Assim como há relação entre o estágio da endometriose e infertilidade, alguns pesquisadores não encontraram associação entre o estágio da doença e a subfertilidade, enquanto outros relatam que a fertilidade diminui com o aumento da severidade da doença (SINAI et al., 2008).

A endometriose tem manifestações clínicas variadas e algumas mais frequentes são: dor pélvica, dor pélvica intensa, endometrioma, infertilidade e distúrbios menstruais.

Os sinais e sintomas da endometriose surgem de sangramentos cíclicos para os tecidos circundantes, resultando em inflamação, cicatrizes e aderências. O risco de desenvolver essa doença pode estar associado a fatores que aumentam o volume, a frequência e a duração da menstruação retrógrada, o que promove a implantação e crescimento das placas de endométrio. Também há indícios fortes de que a mesma seja influenciada por hormônios esteróides (VITONIS et al, 2010).

Alguns marcadores biológicos (sorológicos ou genéticos) como CA-125, ou polimorfismos genéticos nas superfamílias do citocromo P450 (CYPs), glutathione S-transferase (GSTs) e assim como a enzima do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), podem mostrar-se discretamente alterados nessa doença. Dessa forma, quando associados à clínica, representam grande potencial no auxílio ao diagnóstico. Assim, enquanto não se tem um diagnóstico categórico, não invasivo, em mulheres com sintomas de endometriose, essa discreta alteração possibilitará a identificação daquelas mais susceptíveis à doença, podendo trazer benefícios ao tratamento (MAYKE et al., 2011).

Segundo a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO, 2015), até 2013 mais de 370 estudos com endometriose e variantes genéticas foram publicados em diversas vias como: molécula de adesão e enzima matriz, ciclo celular, citocinas, receptores hormonais, enzimas e sistemas metabólicos onde está inserida a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), objeto deste estudo, quando tem sua expressão alterada, está envolvida no desenvolvimento da endometriose, e o polimorfismo G894T do gene *eNOS* modula a angiogênese, o que influencia na suscetibilidade individual à endometriose (KIM et al., 2009).

O desenvolvimento deste estudo justifica-se pela necessidade de se desvendar alguns enigmas da endometriose como sua etiologia. Segundo a FEBRASGO, (2015), a endometriose é conhecida como uma enfermidade contemporânea, em mulheres com mais menstruações, menos filhos, menstruações mais precoces e gestações tardias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 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). Cruveilhier, em 1835 d.C., fez referência a lesões císticas de anexos, útero e vagina (BARANOVA et al., 1987; PODGAEC, et al., 2007).

Na idade clássica e antiga (4000 a.C. – 476 d.C.), existia um conceito básico relacionado às desordens femininas de que o útero não seria um órgão regular, mas sim algo semelhante a um animal vivo ou útero animalesco, ávido pela maternidade. Vários dogmas surgiram então de forma duradoura na medicina antiga, como o de que, quando a mulher que não atingia este propósito (a maternidade), seu útero vagaria, ao léu, desviado e contribuindo para o surgimento de doenças; e existe, no conceito atual da doença, uma conexão causal entre a gravidez e a supressão dos sintomas, conforme relata a FEBRASGO (2015). Ainda na idade antiga, apareceram textos Hipocráticos relacionados à doença, nos termos de estrangulação do útero ou sufocação. Apesar de esse termo ter sido usado com significados contraditórios no decorrer da história, sua origem parece ter surgido nos postulados dos egípcios antigos por volta do ano 1855 a.C. O filósofo Platão foi um dos primeiros a mencionar a dor extrema que as mulheres sofriam em decorrência da sufocação do útero.

Nos anos 98 d.C. – 138 d.C., Sorano de Éfeso foi o primeiro a sugerir a inflamação uterina como um fator importante na origem da sufocação do

útero. Galeno (129 – 216 d.C.) propôs uma nova teoria na qual as aderências e/ou infiltrações dos ligamentos pela endometriose desencadeassem a sufocação do útero. Naquela época pensavam em membranas que ancoravam o útero, retendo o sangue e tornariam tensas (BROSENS et al., 2012; PODGAEC, 2015).

Marques (2005) relata que o histórico da endometriose é bastante prejudicado, por ter sido negligenciado por muitos anos. Entretanto, há muito se tem investigado essa doença, visto que um estudo publicado por Knapp (1999) demonstrou que as primeiras descrições da endometriose 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*” (FEBRASGO, 2015).

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, 2005; SILVA et al., 2011).

Tailford (1765) pode ter sido o primeiro a enfatizar o comprometimento ovariano na endometriose e Hoctin (1779) relatou a importância da dor pélvica no quadro clínico da doença (SILVA, 2011).

Carl Von Rokitansky (1860) d.C., na Alemanha, fez a primeira descrição patológica de um caso de endometriose, quando se deparou com a presença de tecido semelhante ao endométrio, ectópico, em peças de necropsia (GIORDANO, 1998; FEBRASGO, 2015)

A teoria de Sampson (1927), a mais divulgada até nos dias atuais, a qual 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; AUGOULEA et al., 2012).

2.2 Epidemiologia

Segundo Yánez e González (2007), a endometriose é um acometimento cujo diagnóstico só pode ser realizado mediante a observação direta das lesões de maneira intencionada por laparoscopia ou como achado transcirúrgico de algum procedimento com outro fim. Devido a isso, há uma dificuldade em representar estatisticamente esse acometimento, pois as pacientes acabam por buscar ajuda médica apenas quando são afetadas por algum sintoma. Velebil, em 1995, demonstrou 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 faixa etária média anual de 32,4 anos, com intervalo de confiança de 95% de 28.5 – 36.3 anos. Estes autores citaram 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 um estudo prévio em 1980,

relatou que 6,9% das hospitalizações por problemas geniturinários se deve a endometriose (GONZÁLEZ; YÁNEZ, 2007).

No caso específico da endometriose, tanto a incidência, quanto a prevalência, são dados especificamente difíceis de ser obtidos, já que o diagnóstico definitivo dessa afecção depende de um exame histológico, o que requer a realização de procedimentos invasivos. Baseado na maioria dos estudos estima-se 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; FEBRASGO, 2015).

De acordo com FEBRASGO (2015), na análise da prevalência da endometriose baseada nos procedimentos do Sistema Único de Saúde (SUS), há um atraso no diagnóstico e tratamento da doença, e a maioria das internações ocorre com mulheres no extremo da vida reprodutiva.

2.2.1 Endometriose e Idade

A endometriose atinge principalmente as mulheres em idade reprodutiva, podendo, no entanto, afetar mulheres fora da faixa reprodutiva como nos estudos de Moen e Shei (1997), que estimaram 2% das mulheres entre 40 e 42 anos com a doença.

A endometriose pélvica é pouco descrita antes da menarca e tende a diminuir após a menopausa. A maioria dos estudos avalia mulheres com idade inferior a 50 anos, e a frequência de endometriose aumentou até a menopausa. Porém, em estudos recentes, essa tendência vem se

confirmando, e têm sido relatados cada vez mais casos desde a adolescência.

Estudos realizados no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP), entre 1992 e 1999, mostraram que mulheres com endometriose, cujos sintomas ocorreram há mais de 5 anos, apresentavam idade entre 30 e 34 anos. Observou-se, assim, que a doença ocorreu em pacientes entre 12 e 80 anos, ou seja, da adolescência até a menopausa (FEBRASGO, 2015).

2.2.2 Hábitos Sociais

Cada vez mais, os profissionais da saúde tendem a considerar que o sedentarismo e a dieta não balanceada, álcool, tabaco e outras drogas, o frenesi da vida cotidiana, são condicionantes das ditas doenças modernas. Este trabalho pretende situar a endometriose também sob esse contexto.

Estudos de Cramer et al. (1986) mostraram que mulheres iniciantes no hábito do tabagismo antes dos dezessete anos, fumando vinte cigarros por dia, apresentavam um risco significativamente menor de apresentar endometriose quando comparadas às não fumantes. Observa-se, diante desse cenário uma controvérsia importante sobre essa análise. Contudo, o próprio Cramer et al. (1986) concluíram 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 encontraram diferença entre fumantes e não fumantes quanto à incidência de endometriose ovariana.

No manual de orientação da FEBRASGO, 2015, recomenda-se a prática da atividade física 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 do início e da frequência, para reduzir os níveis de estrogênio circulante nas praticantes.

2.3 História Familiar

As limitações diagnósticas dificultam a pesquisa nos antecedentes familiares da mulher que questiona sobre sua predisposição à endometriose, haja vista o procedimento invasivo para o diagnóstico (MARQUES, 2005).

Alguns estudos de Bischoff e Simpson (2004) e Moen e Magnus (1995), afirmaram que a presença da doença em parentes de primeiro e segundo grau aumenta a incidência em algumas pacientes de 5% a 7%; E que identificar um fator familiar ou mesmo genético que predisponha a mulher a ter endometriose é algo difícil pelas próprias limitações diagnósticas.

No trabalho de Ranney (1971), foram realizadas entrevistas com 350 pacientes operadas devido a endometriose, mostrando que 22% delas tinham 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. Há necessidade de estudos profundos para esclarecer se os resultados acima citados são devido 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; SIMPSON, 2004).

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

Fica evidente 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, 2009).

2.4 Endometriose e diagnóstico

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, (2007) classifica a endometriose em quatro estágios: I-mínimo, II suave, III moderada e IV grave, dependendo da localização, a extensão e a profundidade dos implantes de endometriose, a presença e severidade das aderências e a presença e tamanho de endometriomas ovarianos. A maioria das mulheres tem endometriose mínima ou leve, que é caracterizada por implantes superficial e aderências leves. No entanto, esse grau de endometriose está fortemente associado com à infertilidade, dismenorreia e dor pélvica crônica. A Endometriose moderada e severa é caracterizada por cistos de chocolate e adesões mais severas (FRARE, 2013).

A endometriose pode ser diagnosticada de quatro formas distintas:

1. Diagnóstico clínico – baseado na história e exame físico;
2. Visualização cirúrgica das lesões;

3. Biópsia das lesões para confirmação histológica;
4. Pesquisa de marcadores bioquímicos, como o CA 125.

Dentre essas possibilidades, o diagnóstico clínico é realizado pelo profissional médico, assim como a visualização cirúrgica das lesões (ACTA MÉDICA PORTUGUESA, 2016).

Quanto à biópsia das lesões, o método é considerado superior para confirmação diagnóstica. Essa metodologia avalia o tecido suspeito na seguinte ordem: glândulas do estroma endometrial; epitélio glandular com hemossiderina e tecido endometrial *like* com hemossiderina. Embora a metodologia seja adequada, os critérios diagnósticos podem variar entre os patologistas e não se tem estudos inter observacionais como os realizados entre os cirurgiões. Um resultado negativo na biópsia não afasta o diagnóstico de endometriose (ACTA MÉDICA PORTUGUESA, 2016; NISOLE, 1997).

Devido ao atraso do diagnóstico da endometriose, há uma busca incessante por um único marcador biológico suficientemente eficaz com essa finalidade. Apesar de mais de cem potenciais marcadores terem sido propostos, nenhum isoladamente ou em associação conseguiu utilidade clínica inequívoca (ACTA MÉDICA PORTUGUESA 2016).

O CA -125 tem sido muito estudado na endometriose e, a primeira vez que foi relatado, esse marcador se mostrou aumentado nas pacientes com endometriose nos graus III e IV, segundo a classificação da *American Fertility Society*(AFS)(NISOLE, 2002). Esse fato foi também relatado no estudo de Barbieri (2002), em 147 mulheres submetidas a laparoscopia/laparotomia diagnóstica.

Outros marcadores como CA-15-3, CA-19-9, antígeno cárcino embrionário (CEA), alfa feto proteína (AFP) e beta2 microglobulina (B2MG), têm sido também investigados nas diferentes fases do ciclo menstrual de mulheres com endometriose sem, no entanto, apresentar resultados significativos (MARQUES, 2005; ABRÃO, 2000). Um estudo em especial dosando os valores desses marcadores em portadoras de endometriose nos graus I, II, III e IV, no primeiro, segundo, terceiro, oitavo, nono e décimo dia do ciclo menstrual, mostrou que os resultados aproximaram-se do normal em todos os casos.

Podgaec et al. (2007), realizaram um estudo para avaliar os marcadores biológicos no sangue e fluido peritoneal de 98 pacientes portadoras de endometriose. Os autores analisaram a relação da predominância dos padrões de resposta imune Th1 e Th2 com dosagens de interleucinas (IL) 2,4 e 10, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- alfa) e interferon- gama (IFN-gama) por citometria de fluxo e observaram a elevação de citocinas relativas à resposta imune Th2, denotando haver um predomínio desse padrão de resposta em pacientes com endometriose.

Entretanto, a FEBRASGO (2015) relata o diagnóstico por imagem como a ultrassonografia pélvica transvaginal, ressonância magnética e o marcador CA125 como auxílio no diagnóstico da endometriose. Destaca-se que a ultrassonografia é um exame considerado bom, rápido e barato, porém não preciso, enquanto que a ressonância magnética é um exame mais específico, que identifica diferentes tecidos e possui melhor acurácia (ANDREUCCI, et al. 2014).

2.5 Endometriose e Infertilidade

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. 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 (OLIVEIRA et al., 2015; OMS, 2009; TRUMMER et al., 2002).

A associação 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 nas trompas e ovários (GÓMEZ e CRUZ, 1997; MAGGIORI et al., 2016).

Alguns dos 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).

Embora esses mecanismos ainda não sejam totalmente conhecidos, assim como 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 ócito 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 (FEBRASGO, 2015; 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 médico, observam-se pacientes que apresentam sintomas exacerbados quanto 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 quanto aos sintomas clínicos e à possibilidade de gravidez. As complicações da endometriose durante a gravidez são raras e não há evidência que seja responsável por abortos (MAGGIORI, 2016).

Segundo a FEBRASGO 2015, alguns fatores que levam a endometriose à infertilidade são: disfunção ovariana, distúrbios de implantação e fatores imunológicos. Em relação à função reprodutiva, é importante que esteja intacto o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal para um bom funcionamento endócrino. A regulação desse eixo é feita por dois hormônios principais, o luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) havendo nos ovários uma concentração exacerbada desses hormônios (GREENSTEIN & WOOD, 2011).

Quando presentes no ovário, os cistos endometrióticos podem ter vários centímetros e são chamados endometriomas ou “cistos de chocolate”. Alterações nesses hormônios podem levar à ausência ou a alterações da ovulação (MOHAN & SULTANA, 2010). Os mesmos autores

observaram um baixo nível dos hormônios FSH e LH em mulheres inférteis comparado com o grupo controle, e um alto nível de prolactina pode levar à infertilidade.

Entre os distúrbios da implantação, a etiologia cromossômica de problemas relacionados à fertilidade se refere a alterações cromossômicas numéricas ou estruturais presentes no casal ou em seus produtos gestacionais, como o aborto espontâneo. Este consiste na perda de uma gravidez, até a vigésima semana de gestação, sem o uso de métodos ou intervenções que induzem ao aborto (WANG et al., 2004). Há evidências de produção de anticorpos antiendometriais em pacientes com endometriose, e discute-se que esses anticorpos poderiam interferir no fenômeno de implantação do zigoto e até contribuir para o abortamento precoce nessas pacientes. Os fatores imunológicos foram inseridos como facilitadores dos implantes ectópicos do tecido endometrial e parecem estar envolvidos na patogênese da endometriose, visto que a enfermidade apresenta característica de doença inflamatória crônica (PODGAEC et al., 2007; VIGANO et al., 1991).

2.6 Fatores Genéticos e Endometriose

A endometriose é caracterizada pela presença e crescimento de células endometriais fora do útero, comprometendo a fertilidade. Os estudos de (ARICI; HALIS, 2004) reafirmam que a doença tem um forte fator genético (TEMPFER et al., 2000; TRELOAR et al., 1999; VIGANO et al., 2007). Esse fator tem sido foco de inúmeros estudos correlacionando a

doença a diversos polimorfismos (PODGAEC et al., 2015; TEMPFER et al., 2009).

Segundo Podgaec et al. em 2015, desde os anos de 1940, diversos estudos relataram parentes afetados pela endometriose, sugerindo assim uma tendência genética. A tendência familiar ou racial na ocorrência da endometriose tem sido objeto de discussão entre estudos genéticos.

O risco genético pode estar associado a um ou mais genes que agem de forma multiplicativa, entre 5% a 8% para parentes de primeiro grau (BIANCO et al., 2015). MISSMER et al. (2004) afirmam que a endometriose pode ser hereditária de forma poligênica.

Esse modelo de herança postula que a doença é causada pela combinação de pequenas variações em múltiplos genes que, aliados a fatores ambientais, podem produzir ou predispor a doença (BIANCO et al., 2015).

LIN et al., 2011 relataram que, para elucidar as causas das variantes genéticas fundamentais na endometriose, muitos pesquisadores enfatizaram, desde a década passada, o termo Gene Candidato. Afirmam que estudos desses genes são menos frequentes que os biológicos, observando uma similaridade entre os estudos e frequentemente com resultados limitados (RAHMIOGLU et al., 2014).

A proliferação de tecido endometrial ectópico tem sido alvo de diversos estudos por meio dos quais 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 (RAHMIOGLU et al., 2014).

Nos estudos *Genome Wide Association (GWA)* de meta-análise, foram incluídos 4.604 casos de endometriose e 9.393 controles de populações com ancestralidade japonesa e europeia; os resultados revelaram regiões comuns no cromossomo 7 em 7p15.2 e no cromossomo 1 em 1p 36.12 nas duas populações estudadas, associadas ao desenvolvimento da endometriose (BIANCO et al., 2015).

A FEBRASGO (2015) relatou a suscetibilidade de endometriose em pacientes nos estudos completos do genoma (GWA), partindo da premissa de que as doenças são causadas por variações genéticas.

Os avanços nos estudos da genética humana resultaram na identificação de genes responsáveis pela maioria dos mais conhecidos distúrbios de gene único, utilizando a análise de ligação. Desordens em um único gene respondem por cerca de 1% das doenças humanas. No entanto, a grande maioria das doenças humanas é herança poligênica, provocada por uma infecção ou outros agentes externos, como também é um produto das interações entre fatores genéticos e externos (FRARE et al., 2013).

Os fatores externos aos quais os seres vivos estão continuamente expostos são os compostos químicos naturais e/ou não naturais. Esses compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira deletéria ao organismo (SILVA et al., 2011). A exposição diária à xenobióticos pode causar a absorção desses, através dos pulmões, da pele ou ingeridos, não intencionalmente, como contaminantes nos alimentos e na

água ou, deliberadamente, na forma de medicamentos com fins terapêuticos ou não. Os xenobióticos podem levar o organismo a produzir respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica, e essas respostas dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (FRARE et al., 2013).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado, ou de fase I, e as enzimas conjugadas, ou de fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). Em contraposição, as reações da fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno, por meio das glutathione S-transferase (GSTs), UDP glucoronil transferase e Nacetil transferase (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (BARBOSA, 2016; FRARE et al., 2013; NAKATA, 2004).

Barbosa et al., (2016) encontraram em seu estudo, em mulheres com endometriose, que o polimorfismo m1 do gene CYP1A1 (P450) *Msp1* é associado à doença e que os polimorfismos W1/m1 e m1/m1 são mais frequentes em pacientes com infertilidade e endometriose severa.

Também foi encontrada uma correlação positiva quando Santiago et al. (2013) compararam o genótipo presente do *GSTM1* com os genótipos do *CYP1A1* e concluíram que os genótipos selvagens dos genes em questão podem atuar como um efeito protetor em relação ao aparecimento e desenvolvimento da endometriose.

A via de metabolização é importante no contexto da endometriose, pois a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), quando tem sua expressão alterada, está envolvida no desenvolvimento da endometriose.

Os genótipos do gene *eNOS* (NOS 3) têm sido responsabilizados pela variação nessa atividade enzimática, assim como na concentração de óxido nítrico no plasma. O polimorfismo G894T do gene *eNOS* deve modular a angiogênese e influenciar na suscetibilidade individual à endometriose (KIM et al., 2009).

2.7- Estresse Oxidativo

O homem e os animais são expostos a um grande número de fatores ambientais como alterações na alimentação, variáveis climáticas, transporte, atividades terapêuticas e profiláticas, vários outros fatores de estresse. A habilidade de ambos em lutar contra esses fatores é importante para a manutenção da saúde e produtividade (RAHAL, 2014).

Estresse, hoje, pode ser definido como um processo alterado de homeostase bioquímica, produzida por estímulo psicológico, fisiológico ou ambiental, sendo rotulado dessa forma sempre que o organismo identificar como ameaça ao equilíbrio homeostático. Na presença desse estímulo, há uma ativação dos mecanismos reguladores neuro-hormonais para a manutenção da homeostase, e qualquer alteração leva a um aumento da produção de radicais livres (RAHAL, 2014).

As espécies livres são instáveis e altamente reativas. Adquirem estabilidade absorvendo elétrons de ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos, proteínas e causam uma reação em cadeia que resulta em dano celular e na doença. Existem dois grandes grupos de radicais livres: Espécies Reativas

de Oxigênio (EROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNS) que é a base deste estudo (SILVA et al. 2011; DUSSE, 2003).

2.7.1 Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNS)

O óxido nítrico (NO) é uma das menores moléculas biossintetizadas, é um radical livre incolor, gasoso, inorgânico que possui sete (7) elétrons de nitrogênio e oito (8) de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (DUSSE, 2003).

A síntese do NO acontece através da conversão enzimática de um dos dois nitrogênios da L-arginina em L- citrulina pela enzima NO sintase (NOS) (AGARWAL et al., 2005; RAHAL, 2014). Após a síntese, o NO difunde-se para células musculares lisas e para o lumen vascular, interage com o ferro da enzima gualinato ciclase, tornando-se ativa e catalisando a guanosina trifosfato (GTP) que origina a guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Esta última é a responsável final pelo relaxamento da musculatura lisa vascular, por meio da redução na liberação e aumento no sequestro de cálcio pelo retículo endoplasmático. No lúmen, o NO liga-se às plaquetas promovendo o aumento da GMPc, redução do cálcio livre e reduzindo a atividade da agregação plaquetária, uma vez que esta é dependente de cálcio (KHAZAEI et al., 2008; RAHAL, 2014) (Figura 2).

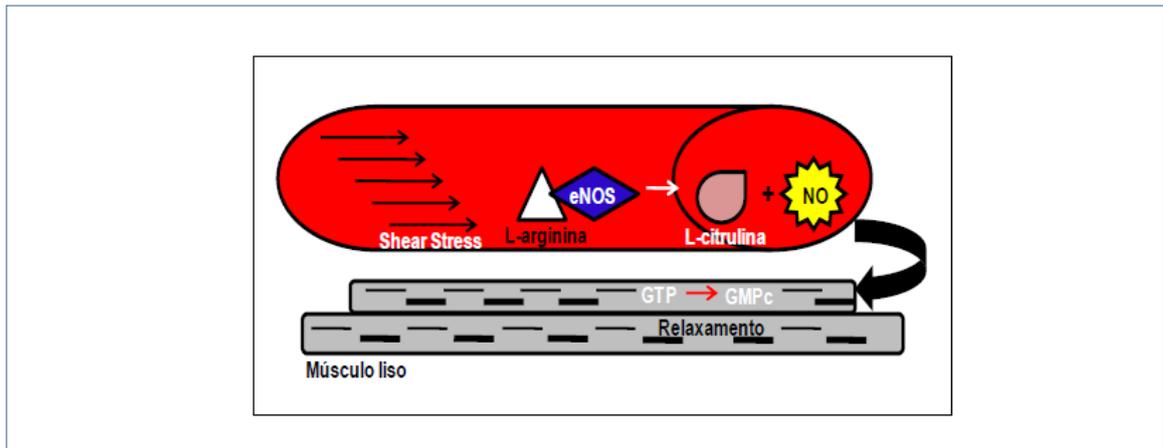


Figura 2—Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO) sob o estímulo do *Shear stress*. A L-arginina é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (*eNOS*), o que promove a formação de L- citrulina e NO. O NO difunde-se para o músculo liso vascular, onde é responsável pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), este por sua vez, reduz a disponibilidade de cálcio promovendo relaxamento. Fonte: <http://www.ufjf.br/pgedufisica/files/2009/06/Disserta%C3%A7%C3%A3o-final-Josiane.pdf>

2.7.2- Óxido Nítrico e Endométrio

Em um corpo saudável, EROS e antioxidantes são balanceados levando ao equilíbrio fisiológico. Quando esse equilíbrio é quebrado, acontece uma exacerbação do estresse oxidativo, afetando múltiplos processos fisiológicos como os reprodutivos, embrionários, com evidência sobre o papel desse evento na endometriose, fatores de infertilidade, tubários e peritoneais, e a infertilidade inexplicada (AGARWAL et al. 2005).

Os radicais livres primários gerados em células são o “superóxido” (O_2^-) e “óxido nítrico” (NO). O O_2^- é gerado por meio de redução incompleta de oxigênio, sistema de transporte de elétrons ou como um produto específico; enquanto o NO é gerado por uma enzima ou sistema de enzimas (NOS) (RAHAL, 2014).

O NO age numa variedade de tecidos a fim de regular diversos processos fisiológicos, mas seu excesso pode ser tóxico. A expressão do NO sintase endotelial e induzível tem sido demonstrada no endométrio

humano, assim como nos vasos endometriais sendo muito importantes na menstruação (TAGUCHI et al. 2000). O NO tem um importante papel na decidualização do endométrio e para preparação deste na implantação do embrião (XAVIER, 2002).

Yeo, et al. (2013) observaram que os Receptores Padrões de Reconhecimento (PRRs), citocinas e NOS, os quais agem na resposta imune, são associados a endometriose.

O NO tem sido implicado no mecanismo de apoptose, através da demonstração do aumento da sua síntese pelas células endometriais na fase secretora tardia e durante a menstruação, tendo sido identificada uma correlação positiva entre os níveis de oxido nítrico e a apoptose ao longo do ciclo endometrial. Atualmente, já é estabelecido um padrão de distribuição do apoptose no endométrio de mulheres saudáveis e de mulheres com endometriose, demonstrando uma correlação entre os padrões de incidência de apoptose encontrados no endométrio de mulheres com infertilidade e os resultados da Fertilização *In Vitro* (FIV) (LASHCKE et al., 2011; XAVIER, 2002).

Existem diferentes mecanismos que envolvem o início da doença. Estes incluem um defeito no sistema imune peritoneal, ou um desequilíbrio oxidativo no fluido peritoneal (LASHCKE et al., 2011). O processo de inicialização, progresso e cicatrização, sofrem a ação do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. A maior via de sinalização da patogênese para o dano celular é a via de peroxidação lipídica em microsomas, mitocôndrias e retículo endoplasmático devido a síntese de O₂ e radical livre. Os fatores responsáveis pelo estresse oxidativo estão direta ou indiretamente

relacionados com o mecanismo de defesa imunológica, e qualquer alteração leva a manifestação da doença (RAHAL, 2014).

Khorrarn and Lessey (2002), em seu estudo sobre a expressão da óxido nítrico sintase endotelial do (eNOS), demonstraram que está aumentada no epitélio glandular e luminal nas pacientes com endometriose. Certificaram o importante papel do eNOS no desenvolvimento dessa doença.

Níveis baixos de NO foram relatados em estudos como importante fator da função ovariana e como causa de relaxamento muscular do oviduto. No entanto, elevados níveis de NO têm efeito deletério na motilidade seminal, são embriotóxicos e inibem a implantação. Nesses mesmos estudos, foram revelados que o aumento dos níveis de NO e expressão de eNOS são detectados no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose. Existem variações de concentração do NO em muitos processos de desordens biológicas e fisiológicas como: doenças inflamatórias e diabetes. (RAHAL, 2014)

Segundo relato de Worley Jr M.J. et al. 2013, o estresse oxidativo resulta quando a produção de *Reactive Oxygen Species* (ROS) excede a capacidade celular de se defender removendo ROS tóxico. O excesso pode resultar danos em proteínas, lipídeos, DNA e membrana celular através de mutações carcinogênicas do DNA ou perda de elétrons. Neste mesmo estudo, foi relatado 54 genes encontrados na *up* regulação do carcinoma celular ovariano, em que 47(87%) são genes redox, incluindo enzimas oxidativas e detoxidativas.

Segundo Laudanski (2013), a mudança seletiva dos genes pode levar ou ter como consequência um defeito na atividade fisiológica proliferativa, resultando no crescimento exagerado de forma ectópica.

Uma das principais características do endométrio eutópico em pacientes com endometriose tem sido a incompleta transição da fase proliferativa (estrogênio-dependente) para a fase secretora (dependente da progesterona), levando a uma expressão persistente de genes envolvidos na síntese de DNA e mitose celular em lesões endometrióticas (SILVA et al., 2016).

O estradiol é um ativador rápido da eNOS, levando ao aumento da produção de NO que, possui propriedades vasodilatadoras, aumentando a secreção glandular cervical, podendo ter implicações sobre a fertilização e a regulação da fertilidade (CAIRES, 2011).

A suscetibilidade a endometriose depende de vários fatores de interação complexa como genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. No entanto, há uma mudança de função da célula normal assim como a proliferação, a migração celular, a invasão e a sobrevivência celular podem estar envolvidas no estabelecimento da doença, e a regulação desses processos consiste em um sistema complexo que assegura a progressão através do ciclo celular (YAMAUCHI, 2004).

Os sinais são integrados por diferentes vias que servirão de gatilho para uma resposta biológica na célula. Uma das principais vias é a RAS/Raf/MAPK (Proteína cinase ativado por mitógeno) que integra os sinais extra-celulares. As quinases regulam os sinais extracelulares (ERK) 1 e 2,

são da subfamília MAP, e são ativadas pela fosforilação para resposta em diferentes estímulos (BLENIS,ROUX; 2004; JOHNSON; LAPADAT, 2002).

A associação da atividade da MAP na patogênese da endometriose foi primeiramente descrito em lesões ectópicas (YOSHINO et al., 2004). A *up*-regulação da sub-familia MAP tem um importante papel na regulação do crescimento e manutenção do tecido ectópico endometrial pela influência da expressão e função de várias citocinas (WU et al., 2006).

Quando estimulado, o ERK sofre uma translocação nuclear, já que sua localização é predominantemente citoplasmática, e quando na presença de fatores de crescimento e um citoesqueleto intacto pode induzir a expressão de ciclina D1 que é crítico para a regulação prévia do *check point* na fase G1 do ciclo celular (APLIN; STEWART, 2001; VELARDE et al., 2009).

Existe uma maior proliferação de células endometriais estromais eutópicas em mulheres com endometriose (Eu-hESC) do que em mulheres sem a doença (Co-Hesc) e foi também proposta a correlação com a *up*-regulação da fosforilação da ERK (MURK et al., 2008; VELARDE et al., 2009).

Esses resultados enfatizam o importante papel da cascata de sinalização Ras/Raf/MAPK como regulador da proliferação celular em células endometriais. Porém ainda se desconhece qual isoforma de Raf é o efetor da Ras no endométrio, se é serina ou treonina. Além do mais, pouco se sabe como a persistente ativação do ERK é alcançada no Eu-hESC e como a via de sinalização RhoA/ROCK II é envolvida nesse processo (KAO, 2003; LESSEY et al., 1994; WU et al., 2006).

Estudos de Burney et al., 2007, demonstraram que o endométrio de mulheres com endometriose exibe um decréscimo de expressão de genes associados com a inativação da cascata de MAPK, fornecendo uma possível explicação para a ativação do ERK e a alta proliferação no Eu-hESC; assim como em outros estudos demonstram o papel da p27 como regulador da proliferação celular, mostrando que essa expressão é fortemente *down-regulada* no endométrio de mulheres com endometriose comparadas com mulheres saudáveis (SHOR et al., 2009).

Segundo Gentilini et al., 2007, o papel das duas vias (Ras/Raf/MAPK e RhoA/ROCKII) é o controle da regulação proliferativa celular tanto no Eu-hESC como Co-Hesc; além disso, foi demonstrado que a migração celular foi maior em células endometrióticas do que em células endometriais, sendo que ambas em condições basais e depois de um estímulo com estrogênio.

2.8 Polimorfismo G894T do gene eNOS

A enzima eNOS foi genotipada e sequenciada por Marsden et al. em 1993, e variações têm sido descritas na região promotora, éxons e íntrons (Genebank D26607).

Há três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) na região promotora, em localizações de não ligação de fatores de transcrição. Nos íntrons 2,11,12,18,22 e 23 foram encontrados SNPs e polimorfismos de sequencias repetidas nos íntrons 2,4,8,e13. Nos íntrons 6 e 7, ocorre a substituição da base nitrogenada guanina por timina (G →T) na posição 894 localizada no éxon 7, resulta na substituição do aminoácido glutamato (GAG)

por aspartato (GAT) na posição 298 da sequência polipeptídica G894T (Glu298) do gene *eNOS* (KIM, 2009; RHAMIOGLU, 2014).

Acredita-se que os polimorfismos localizados na região promotora do gene desempenham influência na transcrição do RNAm, enquanto os polimorfismos localizados em regiões codificadoras podem resultar em alterações de atividade enzimática (KIM, 2009; RHAMIOGLU, 2014).

A partir do aminoácido L-arginina, a produção enzimática do NO é mediada por uma família de três sintases de óxido nítrico (NOS), que são codificados por diferentes genes. Essas isoformas compartilham de 50 a 60% de homologia na sequência de aminoácidos nos domínios oxidase e redutase e exibem características distintas que refletem suas funções específicas *in vivo* (DIAS et al, 2011).

A sintase endotelial (*eNOS* ou NOS 3) situada no cromossomo 7q35-36 é o foco deste estudo (Figura 3); e as demais são as isoformas neuronal (*nNOS* ou NOS1 12q24.2) que é constitutiva e a isoforma induzida (*iNOS* ou NOS2 17cen-q12). A enzima *eNOS* funciona como um dímero de dois monômeros idênticos, que possuem dois domínios funcionais: um C-terminal redutase, homólogo ao citocromo P450 e que contém sítios de ligação para NADPH, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e um domínio terminal oxidase, que abstrai um elétron do substrato L-arginina e possui sítios de ligação para o ferro heme, para o cofator tetrahydrobiopterina (BH4) e para L-arginina, sendo o ferro heme essencial para a dimerização das três isoformas (DIAS et al., 2011). O mesmo autor afirma que onde há baixas concentrações ou ausência de L-arginina ocorre a catalização da redução do oxigênio em superóxido (O₂); e níveis

diminuídos de BH4 levam à produção simultânea de NO e O₂, formando o peroxinitrito (ONOO).

Os polimorfismos mais estudados do gene eNOS são: 786 (T/C) na região promotora do gene, o Glu298Asp no exon 7 (-894 G/T) e um VNTR (*Variable Number of Tandem Reapeats*) de 27 pares de bases no íntron 4.

Como citado anteriormente, o gene eNOS situa-se no braço longo do cromossomo 7(7q35-36) e contém 26 éxons ao longo de 21 kilobases de DNA genômico e codifica um RNA mensageiro de 4052 nucleotídeos (KIM et al, 2009).

Khorrarn e Lessey (2002) demonstraram que a expressão da eNOS é significativamente maior no epitélio glandular e luminal nas pacientes com endometriose facilitando o desenvolvimento da doença. A enzima eNOS tem um importante papel no desenvolvimento da via angiogênica na endometriose, sendo crucial para a sobrevivência do tecido endometrial ectópico, fora do útero, assim como a progressão da endometriose (KIM et al., 2009).

O polimorfismo G894T é o alvo desta pesquisa e ele tem uma importância singular na funcionalidade do óxido nítrico sintase endotelial. Sabe-se que a substituição do glutamato pelo aspartato na posição 298 da eNOS aumenta a suscetibilidade da clivagem por proteínas. Em consequência disso, tem-se a diminuição da produção de óxido nítrico basal, que é responsável por manter a homeostase corporal (CHOUDHARI et al., 2013; WU et al., 2006).

Nas células endometriais, o NO é sintetizado pela enzima eNOS e esta é expressa no ciclo menstrual normal. Essa expressão aumenta em

pacientes com endometriose comparada com mulheres sem endometriose. O alto nível do NO foi encontrado no endométrio ectópico comparado com o endométrio eutópico (KIM, et al. 2009; Wu et al., 2003).

Hoon Kim, (2009), considerou importante a existência da associação do polimorfismo G 894T (Glu298) do gene *eNOS* e endometriose e concluiu que esse polimorfismo é associado ao risco avançado da doença, embora os mecanismos dessa associação precisem ser desvendados. Pode-se afirmar que há o importante papel do polimorfismo do gene *eNOS* na patogênese da endometriose, assim como a diferença étnica na frequência desse polimorfismo, contribuindo para o aumento do risco da endometriose.

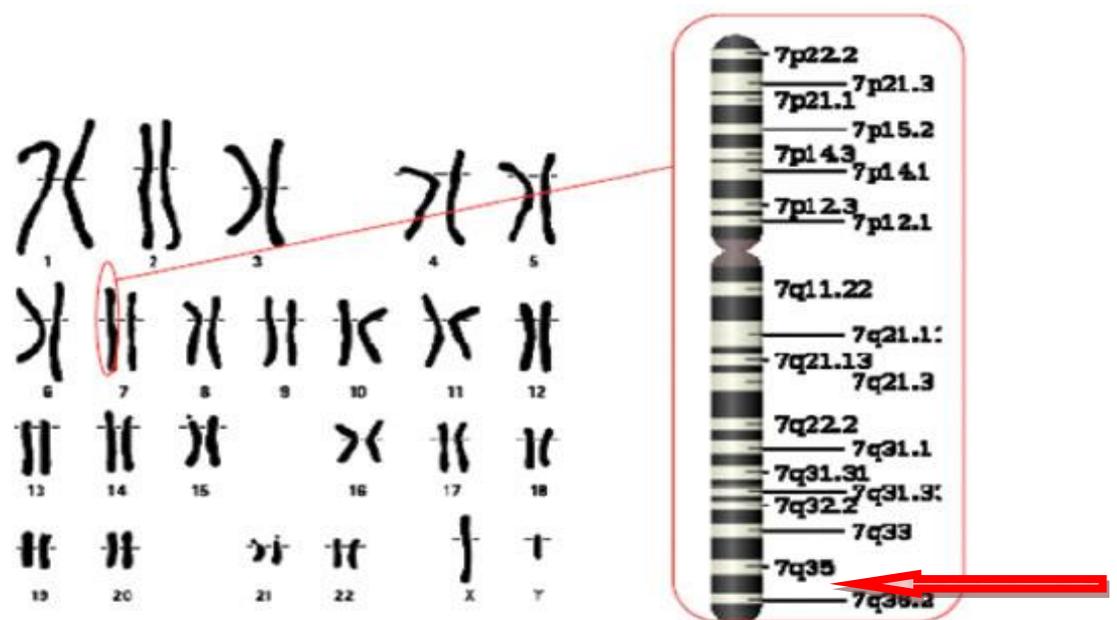


Figura 3- Esquema do cromossomo 7 indicando com seta a localização do gene Glu 298 Asp. Adaptado pelo autor. Fonte- Genbank 2016.

No presente estudo, pesquisamos essa associação, assim como procuramos desvendar os enigmas dessa doença contemporânea com uma etiologia e epidemiologia surpreendente quando analisamos a frequência alélica e genotípica desse polimorfismo.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

O objetivo geral deste foi analisar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo G894T do gene *eNOS* em mulheres com endometriose, de acordo com a fertilidade e a infertilidade.

3.2 - Objetivos específicos

- Pesquisar a distribuição genotípica do polimorfismo G894T do gene *eNOS* em relação às características gerais, nas pacientes com diagnóstico de endometriose e nos subgrupos férteis e inférteis.
- Pesquisar a frequência genotípica e gênica do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nas pacientes com diagnóstico de endometriose, e nos subgrupos férteis e inférteis.
- Delinear o modelo de expressão genotípica para o polimorfismo do G894T do gene *eNOS* nas pacientes com diagnóstico de endometriose, e nos subgrupos férteis e inférteis.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de Pesquisa

Estudo analítico de corte transversal, cujas amostras foram coletadas entre janeiro de 2009 e dezembro de 2010, na cidade de Goiânia, Goiás.

4.2 Projeto e Amostras

Num total de 52 amostras foram selecionadas para amostra populacional geral, e cinco (5) tinham volume insuficiente para genotipagem. Assim, de 47 mulheres com diagnóstico de endometriose confirmado por videolaparoscopia, foram coletados 10 ml de sangue periférico e armazenados em tubos de ensaio com 03 gotas de EDTA (Etilenodiaminotetracético). As pacientes assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) (Anexo 2) e responderam um questionário (Apêndice 2), para cor de pele (autodenominada). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) 0126.0.168.000-08 (Anexo 1). As pacientes foram subdivididas em dois grupos: férteis, quando relataram uma gravidez a termo, sem reprodução assistida e inférteis, com queixa de infertilidade.

As amostras sanguíneas foram estocadas em refrigerador a - 20°C até a extração de DNA.

4.3 Extração e Quantificação

A extração de DNA do sangue periférico seguiu as instruções de acordo com o fabricante do kit GFX™ (*Amersham Pharmacia Biotech*, EUA).

O DNA teve sua concentração e pureza determinadas por meio da razão das leituras de absorvância a 260 nm e a 280 nm, no espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (*Amersham Pharmacia Biotech*). A verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após 50 minutos em eletroforese a 90 volts, o gel foi tratado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (*Invitrogen Corporation*), conforme instrução do fabricante, e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Amersham Biosciences, USA*). A quantificação do DNA foi realizada no equipamento “*Nanovue Plus*” G.E. health.

4.4 - Critérios de inclusão:

- 1) Diagnóstico histológico de endometriose após videolaparoscopia;
- 2) Diagnóstico Clínico de Fertilidade ou Infertilidade
- 3) Idade entre 20 e 40 anos.

4.4.1 Critérios de exclusão:

- 1) Outras patologias uterinas ou intra-peritoneais associadas;
- 2) Doenças sistêmicas descompensadas;
- 3) Impossibilidade de obtenção de dados da cirurgia e histopatologia no prontuário;
- 4) Impossibilidade de contato com as pacientes;
- 5) Impossibilidade de extração do DNA.

4.5 - Análises do Polimorfismo

Para a amplificação do polimorfismo G894T foi utilizada a técnica molecular RFLP ((*Técnica de Restriction Length Polymorfism – RFLP*), nas condições descritas nos quadros 1, 2 e 3 (KIM, et al., 2009).

Quadro 1 – Protocolo para amplificação do polimorfismo G 894T do gene eNOS- PUC GOIAS 2015.

REAGENTES	Concentração UTILIZADA	VOL.P/ 1 AMOSTRA
Água	-----	2 µL
DNA	25ng	1 µL
Primer FW	20 µM	1 µL
Primer Rev	20 µM	1 µL
*Master Mix	-----	45 µL
Volume final		50 µL

* A mistura contém Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl₂ e dNTPs em concentrações suficientes para 100 reações de PCR com volume final de 50 µL (QUATRO G, 2013). FW – Glu 298 Forward, Rev – Glu 298 Reverse; Fonte: Hoonkim et al., 2009

Quadro 2 – Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers do polimorfismo G 894T PUC GOIAS 2015.

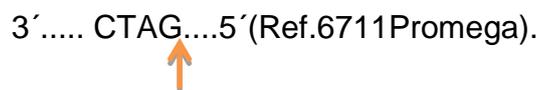
	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°	5`	30
Amplificação	94°	1`	
	58°		
	72°		
Extensão	72°	10`	

Fonte: Hoonkim et al., 2009.

Os fragmentos foram amplificados para o polimorfismo G894T do gene eNOS. Após, foi realizada a digestão desses fragmentos, empregando-se a enzima MboI na técnica de RFLP, segundo o protocolo Sambrook (1989); Hoon Kim (2009) (Quadro 3).

A seleção da enzima é a que cliva uma sequência que existe numa das formas do polimorfismo, mas não na outra. Assim, a sequência de um

dos alelos é clivada e a do outro não. Na presença do Alelo G (selvagem), a sequência de 206 pares de bases não é clivada, e o fragmento de DNA que possui a sequência reconhecida pela endonuclease é dividido em dois ou mais fragmentos, no caso o Alelo variante T (alelo polimórfico), que produz dois fragmentos de 119 e 87 pares de bases, de menor tamanho que o inicial (Sambrook *et al.*, 1989). A enzima utilizada neste trabalho foi a Mbol o reconhecimento da sequência: 5'↓GATC ...3'



Quadro 3- Protocolo de digestão para amplificação dos fragmentos de DNA do polimorfismo G 894T (Glu298) do gene eNOS. PUC GOIÁS 2015.

Reagentes	Vol. (μL) 1 amostra	Vol.(μL)X amostras
Água	15,8	
Tampão	2,0	
BSA	0,3	
Enzima - Mbol		1
Vol da amostra PCR		10
Total		20

Tampão Multi-Core TM ; BSA –Albumina Sérica Bovina. Fonte: Promega

Todas as reações foram realizadas em duplicatas e com controle interno da reação. O produto obtido de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em um campo elétrico de 10 V/cm corado com brometo de etídio (5μg/mL) (Figura 4), e o registro visual do gel foi efetuado com o auxílio do VDS.

Os possíveis resultados dos genótipos do polimorfismo G 894T do gene eNOS com o uso desses *primers* são GG,GT ou TT após o uso da enzima de restrição para digestão, figura 4.

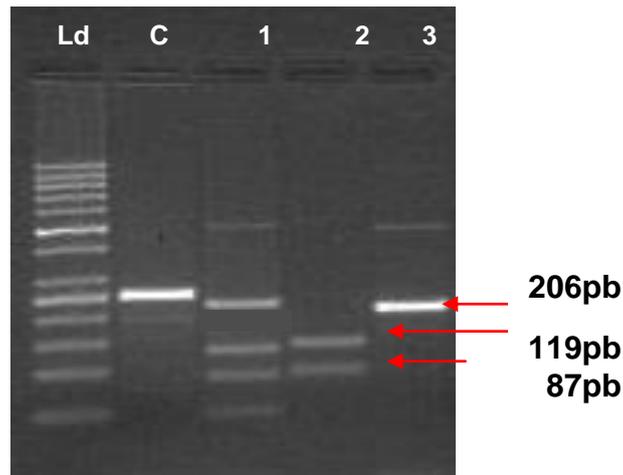


Figura 04: Gel de agarose 1,5% mostrando amplificações para o polimorfismo Glu298Asp do gene *eNOS* na presença da enzima Mbol. Nas colunas de 1 a 3 estão amostras de pacientes que amplificaram a região do polimorfismo G 894T (Glu298) do gene *eNOS*. A amostra 1 é heterozigoto GT (206pb, 119pb e 87pb), amostra 2 homozigoto TT (119 pb e 87pb) e amostra 3 homozigoto GG (206 pb). O padrão de peso molecular (Ld) utilizado nesta análise foi de 50pb e o controle da reação na coluna C é homozigoto GG (206 pb).

4.6 - Análise Estatística

O programa estatístico usado foi software SPSS 2015, onde, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O teste t de Student foi usado para comparação das médias de idades e calculado o desvio padrão, e escolhido através do teste de aderência Kolmogorov-Smirnov; o teste do Qui-quadrado e exato de Fisher foi utilizado para a verificação de diferenças significativas entre a análise molecular das pacientes, na análise da frequência dos genótipos GG, GT e TT do polimorfismo G894T do gene *eNOS*, nos cálculos da dominância, codominância e recessivo em pacientes com endometriose em Goiânia, Goiás.

5 RESULTADOS

5.1- Características Gerais das pacientes

A amostra do estudo genotípico foi constituída por 47 mulheres com idade média de $33,3 \pm 2,9$ (28,0 - 38,0), que se autodeclararam de cor branca 88,5% (40/47) e negra 11,5% (7/47), sendo 48,9% (23/47) férteis e 51,1% (24/47) inférteis. As pacientes férteis apresentaram média de idade de $34,0 \pm 2,5$ anos (28,0 – 38,0), enquanto que as pacientes inférteis apresentaram média de idade de $32,7 \pm 2,3$ anos (30,0 – 38,0).

Dentro das características, foram incluídos os aspectos sóciodemográficos, clínicos e hábitos sociais como: raça e classificação do grau da endometriose. A apresentação dessas características gerais está demonstrada em forma de tabela inserida no apêndice (1) e, a seguir, estão relatados os resultados obtidos dessas análises considerando a população total de 52 pacientes.

Em relação à cor da pele, observa-se uma maior porcentagem de mulheres que se autodeclararam de cor branca (88,5%). Entretanto, não houve associação significativa dessa variável com a condição de fertilidade ($p = 0,503$).

Entre os dados obtidos nos prontuários, é interessante observar que as pacientes com diagnóstico de endometriose relataram a infertilidade como queixa principal (54%), seguida de dor pélvica e dor pélvica intensa, citada por 29% e 17%, respectivamente, do total de mulheres. Quando o

grupo de pacientes foi dividido em subgrupos de férteis e inférteis houve uma forte diferença ($p < 0,001$) entre a queixa principal nas férteis foi a dor pélvica 62,5% (15/24) em relação às inférteis 100% (28/28). A infertilidade foi a queixa principal nas pacientes inférteis, já que o foco para esse grupo de pacientes era a possibilidade da maternidade.

A dor pélvica e a dor pélvica intensa foram novamente relatadas pelas participantes, mas na variável demais sintomas, por 23,1% e 19,2%, respectivamente, e 23,1% do total não relataram nenhuma dessas variáveis. O sangramento foi citado por 17,3%; sangramento associado a dor pélvica por 7,7%, endometrioma por 5,8% e endometrioma associado a dor pélvica intensa por 3,8 % das mulheres.

Com relação à duração dos sintomas, o período entre 0 e 3 anos foi relatado por 43% das pacientes e entre 3 e 6 anos, foi relatado por 45%. Uma duração maior entre 6 a 8 anos foi relatada por 12% das mulheres. Na análise da duração desses mesmos sintomas, não houve diferença $p = 0,260$. Quando analisamos entre subgrupos de férteis e inférteis, foi encontrado de 0 —| 3 anos 54,0% (13/24) das pacientes férteis e 33,0% (9/27) das inférteis; no intervalo de 3 —| 6 anos, 33,0% (8/24) das férteis e 56,0% (15/27) das inférteis; já no intervalo de 6 |—| 8 anos, 13,0% (3/24) das férteis e 11% (3/27) das inférteis.

Em relação ao período do ciclo menstrual, quando os sintomas aparecem, 47% relataram que os mesmos ocorrem no período menstrual, seguido por 37% no período pré e menstrual e 16% no período pré-menstrual. A análise no período do ciclo menstrual, na mesma frequência dos sintomas entre as férteis e inférteis, houve uma diferença $p = 0,006$,

quando no período pré-menstrual 4,2% (1/24) foi relatado nas férteis e 26,0% (7/27) nas inférteis; no período pré + menstrual, 58,3% (14/24) nas férteis e 18,5% (5/27) nas inférteis; e durante todo o ciclo, 37,5% (9/24) nas férteis e 55% (15/27) nas inférteis.

Segundo o grau de endometriose, verificou-se que 37% do total de mulheres apresentaram grau III. Nos graus I e II a doença foi detectada em 22% das mulheres. O grau IV foi detectado em 19%. A análise da distribuição da frequência das pacientes férteis e inférteis, de acordo com o grau de classificação da doença segundo a "*American Fertility Society*", não mostrou diferença $p = 0,585$, quando, no Grau I, foi de 17,0% (4/24) das férteis e 26,0% (7/27) das inférteis; no Grau II, foi de 29,0% (7/24) das férteis e 15,0% (4/27) das inférteis; no Grau III, foi de 33,0% (8/24) das férteis e 41,0% (11/27) das inférteis; no Grau IV foi de 21% (5/24) das férteis e 18,5% (5/27) das inférteis.

Quanto aos hábitos sociais, a atividade física leve foi relatada por 45% das pacientes; 35% não praticavam qualquer tipo de atividade física e 20% praticavam atividade moderada. Na análise da distribuição da frequência dos hábitos sociais entre as pacientes férteis e inférteis que praticam atividade física, não houve diferença $p = 0,192$ e as pacientes que não praticavam atividade física foi de 29,2% (7/24) das férteis e 41,0% (11/27) das inférteis; as que tinham atividade leve foi de 58,3% (14/24) das férteis e 33,0% (9/27) inférteis; as que praticavam atividade física moderada foi de 12,5% (3/24) das férteis e 26,0% (7/27) das inférteis.

A distribuição das pacientes em relação ao hábito de fumar mostra que a população analisada era composta por 94% de não fumantes. A análise da distribuição da frequência das pacientes férteis e inférteis que fumavam não mostrou diferença $p = 0,623$; já as que não fumavam foram 96,0% (23/24) das férteis e 92,5 (25/27) das inférteis; entre as que fumavam 4,0% (1/24) eram férteis e 7,5% (2/27) eram inférteis.

Em relação ao uso de bebidas alcoólicas, do grupo total das amostras, 90% não faziam uso de bebida alcoólica e 10% bebiam. Na análise da distribuição da frequência das pacientes férteis e inférteis que ingeriam bebida alcóolica não houve diferença $p = 0,542$; já as pacientes que não bebiam foram 87,5% (21/24) das férteis e 92,5% (25/27) das inférteis.

5.2 Análise genotípica do Polimorfismo do gene eNOS G894T

Para análise genotípica, foi utilizada a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphism*) e dentro das características gerais, incluímos, além da raça, classificação do grau da endometriose, dados clínicos e hábitos sociais. A apresentação dessas características gerais foi demonstrada em forma de tabela que está inserida no apêndice (1).

A seguir, estão relatados os resultados da análise genotípica, obtidos dessas características a fim de facilitar uma análise genética mais detalhada.

Na variável queixa principal das pacientes com diagnóstico de endometriose, a frequência do genótipo GG foi de 35,7% (10/28) das pacientes que relataram como queixa principal a dor pélvica, 21,4% (6/28) das pacientes que relataram a dor pélvica intensa e 42,9% (12/28) relataram a infertilidade. O genótipo GT foi encontrado em 35,7% (5/14) das pacientes

que relataram como queixa principal a dor pélvica, 14,3% (2/14) a dor pélvica intensa e 50,0% (7/14) a queixa de infertilidade. A frequência do genótipo TT foi encontrada em 100,0% (5/5) das pacientes que relataram como queixa principal a infertilidade.

Quanto aos demais sintomas ou sintomas secundários no total das amostras, a frequência do genótipo GG encontrada foi de 10,7% (3/28) das pacientes com sintomas a dor pélvica; 25,0% (7/28) dor pélvica intensa; 17,9% (5/28) o sangramento; 7,1% (2/28) o sangramento e dor pélvica; 7,1% (2/28) tiveram tanto a dor pélvica quanto o endometrioma e 32,1% (9/28) não relataram sintomas. A frequência do genótipo GT foi 21,4% (3/14) das pacientes com sintomas de dor pélvica, 7,1% (1/14) a dor pélvica intensa; 21,4% (3/14) o sangramento; 7,1% (1/14) dor pélvica e sangramento; 14,3% (2/14) tiveram endometrioma; 7,1% (1/14) a dor pélvica e endometrioma, 21,4% (3/14) não relataram demais sintomas. A frequência do genótipo TT foi de 80,0% (4/5) nas pacientes com sintoma de dor pélvica e 20,0% (1/5) tiveram dor pélvica e endometrioma.

Com relação à duração dos sintomas, temos na análise genotípica que, no intervalo de 0 |— 3 anos, a maior frequência foi GT 64,3% (9/14). Já de 3 |— 6 anos, foi GG 42,9% (12/28); e no período entre 6 |—|8 anos, a maior frequência foi o genótipo TT 20,0% (2/5). Não se observou diferença estatística.

Na distribuição da frequência genotípica quanto ao período do ciclo menstrual, quando aparecem os sintomas, temos: no período pré-menstrual, a presença do genótipo GG e GT foi de 14,3% (4/28); e de TT não houve

relato. Nos períodos pré e menstrual, GG foi de 39,3% (11/28); GT de 42,9%(6/14) e de TT 40,0%(2/5). Já em todo o ciclo menstrual, o GG foi de 46,4%(13/28); GT de 42,9%(6/14) e TT de 40,0%(2/5). Nessa variável a análise não foi significativa estatisticamente, e observamos a presença dos genótipos do polimorfismo em todo o período menstrual, como também a ausência do genótipo TT na fase pré- menstrual.

Quanto ao grau de classificação da endometriose (I/II, III/IV), 98% (46/47) das pacientes informaram resultados histológicos, e a associação das variáveis como grau de classificação I / II da endometriose detectou-se a frequência do genótipo GG 42,8% (12/28), GT 35,7% (5/14) e TT de 20% (1/5). Já nas pacientes com endometriose de grau de classificação III/IV, GG foi de 57,1% (16/28), GT 64,3% (9/14) e TT 60% (3/5). Verificou-se que a frequência genotípica TT nas pacientes com endometriose no grau de classificação III/IV foi aproximadamente 3,0 vezes maior que nas pacientes com grau I/II.

A seguir relatou-se a análise da frequência genotípica das variáveis de hábitos sociais como: prática de exercícios físicos, hábito de fumar e ingestão de bebida alcoólica. A frequência do genótipo GG foi de 32,1% (9/28) das que não praticavam atividade física, 46,4% (13/28) das que praticavam atividade leve, e 21,4% (6/28) das que praticavam atividade moderada. Quanto à frequência do genótipo GT, foi de 50% (5/14) que não praticavam atividade física, 35,7% (5/14) praticavam atividade leve, e 14,3% (2/14) praticavam atividade moderada. A frequência do genótipo TT foi de 20% (1/5) que não praticavam atividade física, e de 60% (3/5) praticavam atividade leve. Embora não tenha dado diferença $p = 0,546$, observa-se que

a frequência dos genótipos são, em média, 2 vezes menor de acordo com o aumento da intensidade da atividade física, observando um efeito protetor.

Com relação ao hábito de fumar e não fumar, respectivamente, a frequência do genótipo GG foi de 3,6% (1/28) e de 96,4% (27/28). O genótipo GT foi de 14,3% (2/14) e 85,7% (12/14), porém quanto ao genótipo TT não foi observado em pacientes que fumavam, sendo presente 80% (4/5) nas que não fumam e 20% (1/5) não houve informação. Observa-se que o hábito de não fumar em relação ao de fumar, a frequência do genótipo mutante foi maior. Na literatura é controverso, e o efeito protetor existe; discute-se a diminuição dos níveis de estrogênios com o hábito do fumo.

Quanto à ingestão de bebidas alcóolicas e sua associação com o genótipo em estudo, foi analisada a frequência genotípica entre a ingestão (uso) e não ingestão (não uso), respectivamente: foi encontrado o genótipo GG 89% (25/28) e 10,7% (3/28), e que a frequência do genótipo GT foi de 85,7% (12/14) e 14,3% (2/14). Já a frequência do genótipo polimórfico TT foi de 80% (4/5) e nula nas pacientes que não fizeram uso; 20% (1/5) não foi informado.

Em relação às variáveis gestações e partos, ressalta-se que todas as pacientes tiveram partos cesarianos. Quanto ao número de gestações (0, 1 ou 2), a frequência do genótipo GG foi de 42,9% (12/28) das pacientes que não tiveram gestação, 35,7% (1/28) das pacientes que tiveram uma (1) gestação e 21,4% (6/28) das pacientes que tiveram duas (2) gestações. A frequência do genótipo GT foi de 50% (7/14) das pacientes que não tiveram gestação, 42,9% (6/14) das que tiveram uma (1) gestação e 7,1% (1/14) das pacientes que tiveram duas (2) gestações. O genótipo TT foi presente nas

pacientes que não tiveram gestação. Nessa condição, não foi significativa $p= 0,209$, porém observa-se a informação importante da presença do alelo homozigoto TT em 100% das pacientes sem gestação.

Quanto aos partos, a análise da frequência do genótipo GG foi de 42,9% (12/28) das pacientes que não tiveram partos, 32,1% (9/28) das pacientes que tiveram um (1) parto e 21,4% (6/28) das pacientes que tiveram dois (2) partos. O genótipo GT foi de 50,0% (7/14) das pacientes que não tiveram parto, 42,9% (6/14) que tiveram um (1) parto e 7,1%(1/14) das pacientes que tiveram dois (2) partos . A presença da frequência do genótipo TT foi em 80% (4/5) das pacientes que não tiveram partos, e 20% sem informação.

A distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nas amostras de pacientes com endometriose estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene *eNOS* nas amostras de pacientes com endometriose em Goiânia, Goiás. 2016.

Endometriose	Genótipo <i>eNOS</i>						Total	
	GG		GT		TT		n	%
	n	%	n	%	n	%		
	28	59,6	14	29,8	5	10,6	47	100

Quando se divide as amostras das pacientes em subgrupos de férteis e inférteis, é possível observar a forte associação estatística de GG e as pacientes férteis, sendo 70% portadoras desse genótipo (Tabela 2). Assim como a associação estatística de TT e as pacientes inférteis, sendo 20,8% portadoras desse genótipo e não foi observada diferença na distribuição genotípica entre subgrupos.

Tabela 2. Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS nas amostras de pacientes com endometriose nos subgrupos Férteis e Inférteis em Goiânia, Goiás. 2016.

Subgrupos	eNOS						Total		p
	GG		GT		TT				
	n	%	N	%	n	%	n	%	
Férteis (n=23)	16	70	7	30	0	0	23	100	0,062
Inférteis (n=24)	12	50	7	29,2	5	20,8	24	100	

Valor de **p** foi calculado pelo teste do qui quadrado

Na tabela 3, na distribuição alélica do polimorfismo G894T do gene eNOS entre pacientes férteis e inférteis foi detectada a prevalência do alelo T em 15% (7/46) nas férteis e 35,4% (17/48) entre as inférteis e apresentou uma diferença estatística significante **p** = 0,04 OR = 3,0 (IC 95% 1,12 – 8,29).

Tabela 3. Distribuição alélica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose nos subgrupos férteis e inférteis em Goiânia, Goiás. 2016.

Variáveis/alelos	G		T		Total	P	OR	IC95%
	n	%	n	%				
Férteis(n=46)	39	85,0	7	15,0	100	0,04	3,0	1,12 – 8,29
Inférteis(n=48)	31	64,6	17	35,4	100			

Valor de **p** foi calculado pelo teste do qui quadrado.

A distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS para a variável cor da pele, auto declarada pelas pacientes em subgrupos de férteis e inférteis, na tabela 4, foram detectados os genótipos em pacientes férteis brancas que apresentaram a maior frequência do genótipo GG 71,4% (15/21). Em pacientes férteis negras, só foi presente o GG 100% (2/2); nas pacientes inférteis brancas, a maior frequência foi do GG 58% (11/19); já nas pacientes inférteis negras foi de GT e TT 40% (2/5). A diferença não foi estatisticamente significante, **p** = 0,121.

Tabela 4. Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T do gene eNOS nas amostras de pacientes com endometriose de acordo com auto declaração de cor da pele em Goiânia, Goiás. 2016.

Variável	eNOS							
	GG		GT		TT		Total	p
	n	%	n	%	n	%		
Férteis brancas	15	71,4	6	28,6	0	0,0	21 (100)	
Férteis negras	2	100	0	-	0	-	2 (100)	0,121
Inférteis brancas	10	52,6	6	31,6	3	16,7	19 (100)	
Inférteis negras	1	20	2	40,0	2	40,0	5 (100)	

Valor de **p** foi calculado pelo teste do qui quadrado.

Na tabela 5, em relação a análise genotípica dos modelos dominantes, codominantes e recessivos, a codominância genotípica apresentou diferença estatística **p = 0,044** para o modelo **GG vs. TT**. Na análise da frequência do modelo recessivo genotípico (**TT vs. GT + GG**), houve significância estatística **p = 0,049**. Analisando a frequência do modelo dominante genotípico (**GT + TT vs. GG**), não houve significância estatística **p = 0,28**.

Tabela 5. Distribuição da análise da frequência alélica e genotípica (dominante e codominante) nos grupos de férteis e inférteis de acordo com o polimorfismo Glu 298 do gene e NOS.

Variáveis	Férteis (n=23) 46 alelos	Inférteis (n=24) 48 alelos	Total (n=47) 94 alelos	P
	n(%)	n(%)	n(%)	
Modelo Codominante				
GG vs. TT	16(69,5) -	12(50) 5(20,8)	28(59,6) 5(10,6)	0,044*
GT vs. GG	7(30,4) 16(69,5)	7(29,2) 12(50)	14(29,8) 28(59,6)	0,913
Modelo Recessivo				
TT vs. GT +GG	- 23(100)	5(20,8) 19(79,2)	5(10,6) 42(89,4)	0,049*
Modelo Dominante				
GT + TT vs. GG	7(30,4) 16(69,5)	12(50)12(50)	19(40,4) 28(59,6)	0,238

*valor de p calculado pelo teste exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

Existem diversos estudos demonstrando que os polimorfismos genéticos desempenham um forte fator no desenvolvimento da endometriose (HALIS e ARICI, 2004; RIBEIRO et al., 2009; TEMPFER et al., 2009; TRELOAR et al. 1999; VIGANO et al., 2007; WENZL et al., 2003).

Até a conclusão do presente estudo não haviam sido publicados trabalhos investigando o polimorfismo G894T do gene *eNOS* em mulheres com endometriose, analisando os subgrupos de férteis e inférteis em nosso país. Para esta análise, foram incluídos alguns aspectos das características gerais e manifestações clínicas como a idade, raça e hábitos sociais.

As mulheres do estudo são de idade fértil e, na comparação das idades entre subgrupos férteis e inférteis, foi observada uma população homogênea embora as mulheres férteis tivessem a média de idade discretamente maior do que as inférteis. A média de idades na literatura internacional varia de 19 a 44 anos (BELLELIS et al., 2010; KIM, et al., 2009) .

Justifica-se a diferença pelo motivo que leva a paciente ao consultório, ou seja, a paciente infértil tem a queixa de infertilidade e, assim, há uma procura precoce ao tratamento, e a paciente fértil só procura quando há sintomas, principalmente dores pélvicas.

A análise em relação à cor da pele demonstrou que 88,5% se autodeclararam brancas sendo predominante em relação a negras (11,5%). Corroboram assim com os estudos de Bellelis (2010); Kuo (2002) e Viganò (2004) que reportam uma grande frequência de endometriose entre

mulheres brancas em relação a não brancas. Enfatizam ainda serem de classe social mais favorecida e consideram o poder aquisitivo como fator de acesso mais rápido ao diagnóstico e tratamento (BELLELIS et al., 2010; FEBRASGO, 2015). Contudo, Houston et al. (1988), Kirshon et al. (1989) não encontraram diferença na incidência entre as diversas raças. Ainda é controversa essa variável na literatura.

Durante a anamnese, segundo Giordano (1998), o sintoma mais frequente na doença é a dor pélvica. Neste contexto esta queixa principal foi maior em férteis (62,5%), enquanto que a variável infertilidade foi a principal queixa entre as inférteis (100%). Na literatura, não foi encontrada essa análise em subgrupos férteis e inférteis, porém, de acordo com a população geral, o estudo retrospectivo de Bellelis (2010) em que 892 pacientes foram submetidas a laparoscopia entre 1999 a 2009, a dor pélvica crônica foi um dos sintomas mais prevalentes (56,8%). Greene, em 2009, avaliou 4.334 mulheres com diagnóstico cirúrgico de endometriose. Quase todas relataram dor pélvica (50%), sendo que estas procuraram o ginecologista como primeiro atendimento, e 45% foram ao médico generalista atrasando o tempo de tratamento. Os dois estudos vão de encontro ao presente estudo.

Giordano (1998), fez um estudo multicêntrico na Itália onde avaliou 3.684 mulheres que foram submetidas a cirurgia por motivos de infertilidade e encontrou 45% com endometriose no grupo de dor pélvica. E como demais sintomas, encontra-se na doença uma manifestação clínica variada, com algumas mais frequentes. A análise da distribuição das pacientes segundo a condição de fertilidade e demais sintomas relatados. Neste estudo, em pacientes férteis, houve sangramento em 37,5%, enquanto que nas inférteis

houve dor pélvica em 43%. Contudo, a FEBRASGO (2015), considera que a dor pélvica crônica possa ser uni ou bilateral, associada à dispaurenia em 71% dos casos, à dismenorreia em 66% dos casos e às queixas álgicas pós coito em 65% dos casos de endometriose. Segundo Oliveira (2015), a dismenorreia foi o mais prevalente (84,2%), principalmente o grau grave, seguido de alterações intestinais (54,4%) e dispareunia (36,9%). É consenso na literatura que a dismenorreia é o sintoma mais prevalente nas mulheres com endometriose.

Quanto à duração dos sintomas, vemos neste estudo que, na população geral, 45% relataram o intervalo de 3 —| 6 anos com a predominância nas férteis (54%) o intervalo de 0 —| 3 anos e nas inférteis, (56%) de 3 —| 6 anos. Esses resultados da população geral corrobora com os estudos de Noaham (2011), concluiu que o tempo de diagnóstico relatado foi de 6,7 anos em centros privados e em 8,3 anos em centros públicos, o que justifica a demora em encaminhar o paciente da rede primária aos ginecologistas. Um estudo de Bellelis (2010) afirma que o diagnóstico da doença é feito na quarta década de vida das pacientes. Enquanto Sinaii (2008) relata a espera do diagnóstico entre 5 a 6 anos.

Segundo Giudice L.C., (2004), a dor pode ocorrer de forma imprevisível e intermitente ao longo do ciclo menstrual. Assim, em relação ao período do ciclo menstrual em que os sintomas aparecem, a análise geral foi que 47% relataram os sintomas em todo o período. Parazzini, Vercellini, e Viganò, em 2004, sugeriram um aumento de risco para as pacientes com fluxo menstrual aumentado e ciclos mais curtos, confirmados com achados cirúrgicos a menstruação retrógrada.

De acordo com Kennedy et al., em 2005, e Oliveira (2015), apesar de algumas limitações, a classificação mais usada, é a da *American Society of Reproductive Medicine (ASRM)*, em que a graduação da doença depende da profundidade de invasão das lesões, da bilateralidade e do envolvimento dos ovários e das tubas uterinas, assim como a densidade das aderências e o comprometimento do fundo de saco de Douglas, em que o estadiamento não se correlaciona com a gravidade dos sintomas e tem valor limitado no prognóstico da infertilidade e na conduta. Foi utilizada essa mesma classificação neste trabalho, em que, segundo o grau de endometriose no total da amostra, 37% apresentaram grau III. Um estudo da ASRM, em 15 artigos selecionados entre 1980 a 2011, foi encontrado 32% nos estádios III e IV, revelando a possibilidade de progressão da doença desde a adolescência. Oliveira, em 2015, encontrou 20,9% no estágio III e 33,6% no IV. Esses dados sugerem que independente do grau, a endometriose é o principal fator de risco para a infertilidade.

Quanto à análise da frequência de mulheres com endometriose associadas aos hábitos sociais: tabagismo, etilismo, uso de anticoncepcionais e prática de exercícios físicos foi analisada e não encontrou uma significância estatística. Missmer, em 2004, relata em seus estudos de endometriose, correlacionaram estilo de vida, doses moderadas de bebida alcoólica e café, concluiu que não estão associados com a fertilidade ou infertilidade e sim com uma relação inversa e contraditória. Entretanto, Martini et al., 2004 e Ribeiro Júnior et al. em 2009, relatam a correlação entre o consumo de bebidas alcoólicas associado ao aumento da

infertilidade de causa anovulatória é devido a endometriose, e que o uso de cinco doses diárias de álcool reduziria em 40% a chance de gravidez.

Neste estudo, constatou-se que das pacientes férteis que tiveram gestações, (49%) tiveram partos cesarianas. A FEBRASGO (2015) cita a nuliparidade como fator para o desenvolvimento da endometriose, já que a gravidez reduz a exposição da mulher à menstruação, e o parto vaginal aumenta o canal cervical, facilitando, assim, o fluxo menstrual e reduz a quantidade de menstruação retrógrada. Cita ainda que, além da ação dos hormônios durante a gestação, também diminui a capacidade dos focos endometriais de implantar e crescer na cavidade pélvica.

Analisando o polimorfismo em estudo associando com as variáveis clínicas e sociais, e a distribuição genotípica, a variável cor da pele foi associada e não teve significância estatística, embora o genótipo mutado TT foi maior em pacientes que se autodeclararam brancas. Na literatura internacional, não há um consenso sobre essa variável e sua associação com o polimorfismo. Temos estudos sobre etnias que, de acordo com Kim et al. (2009), diz que a frequência do alelo T está presente em 32% em mulheres com endometriose caucasianas e Indianas, enquanto Zervou et al., (2003), relatam que 65,8% entre mulheres gregas. Bahnoori et al., (2008), não encontraram diferença entre as mulheres Indianas. Existem autores como Kirshon et al., (1989); Houston et al., (1988), que afirmaram não mostrar diferença na incidência entre as diversas raças. Por outro lado, Chatman, (1976), defende a prevalência da doença na raça negra, e Miyazawa, (1976), destacou a raça amarela como a predominante. No Brasil, quando analisamos a cor de pele como etnia, ela sempre é

autodeclarada o que dificulta a sua comparação com os estudos de outros países. Assim, também Sergio Pena, (2000), declara que a miscigenação da população brasileira é única no mundo, e que 60% de matrilineagens ameríndias e africanas estão altamente presentes no homem branco brasileiro.

Observa-se que na avaliação dos demais sintomas como a dor pélvica, dor pélvica intensa, sangramento, dor pélvica e sangramento, endometrioma, endometrioma e dor pélvica, a infertilidade não foi citada com os demais sintomas. Observou-se também que os genótipos estão presentes em todos os sintomas e que 80% do genótipo mutado está na queixa de dor pélvica. Esses resultados corroboram com a sugestão de que há suspeita de endometriose naquelas pacientes com queixa de infertilidade, dor pélvica cíclica, especialmente exacerbada durante a menstruação (dismenorréia) e a dispareunia profunda (RIBEIRO, 2009). Alguns estudiosos clássicos como Hasson, (1976) e de Wheeler, (1989) relatam que 6% a 58% das pacientes com infertilidade apresentam endometriose e Fedelle et al. (1992); Thomas (1995) relataram que 30% a 50% das mulheres com endometriose são inférteis (GIORDANO, 1998).

Com relação a análise da duração dos sintomas associados ao polimorfismo, não houve significância estatística e observou-se que os genótipos estiveram presentes em todos os intervalos. Não foram encontrados dados na literatura científica para essa variável, em associação com o polimorfismo em estudo.

Segundo Kim et al., (2009); e Zervou, (2003), a enzima eNOS é super expressa durante o ciclo menstrual na endometriose, e o acúmulo de óxido

nítrico modula a inflamação, implantação e vasodilatação. Assim, vai de encontro aos resultados que os genótipos estão mais frequentes em todo ciclo menstrual, inclusive a presença do alelo T nas fases pré, pré + menstrual e ciclo todo.

Na análise da distribuição genotípica do polimorfismo em estudo segundo o grau de classificação da endometriose, verificou-se uma maior frequência nos graus III/IV de acordo com AFS. Estudos de Kim et al., (2009), revelam que a presença do alelo T está associado a progressão da endometriose, embora o autor não tenha encontrado significância estatística nos estádios III e IV. Assim como citado, a presença de radicais livres como o óxido nítrico acumulados levam à inflamação, implantação e angiogênese (ZERVOU et al., 2003).

Ainda quanto aos hábitos sociais, observou-se embora não significativo, que a presença dos genótipos do polimorfismo G894T(Glu 298Asp) foi maior em mulheres que não praticavam atividade física ou que a praticavam de forma leve. Embora não tenha sido encontrada na literatura científica a associação realizada neste estudo esse resultado encontrado corrobora com os estudos de Cramer (1986) o qual afirma que a atividade física seria um benefício adicional, na medida em que melhora a imunidade das pacientes. E, segundo a FEBRASGO (2015), leva-se em consideração que esse efeito protetor depende da época de início e da frequência, para induzir os níveis de estrogênio circulantes nas praticantes.

Temos uma variável controversa na literatura, que é o hábito de fumar. Observou-se que a frequência dos genótipos foi maior em pacientes não fumantes. Temos um cenário de controvérsia importante sobre essa

análise; contudo, Cramer et al, .(1986) , concluíram que a mulher que fuma mais de vinte cigarros por dia tem seu nível sérico de estrogênio diminuído e, portanto ela estaria “protegida” contra a endometriose. Por outro lado, Parazzini et al., (1989), não encontraram diferença entre fumantes e não fumantes em suas pesquisas na endometriose ovariana. Segundo a FEBRASGO (2015), os dados publicados quanto à relação do fumo e endometriose são limitados e controversos.

Parazzini, em 2013, no seu estudo de revisão sistemática da literatura sobre a influência dos fatores dietéticos na endometriose, concluiu que, até o presente momento, qualquer associação entre endometriose e dieta é considerada limitada por falta de evidências (FEBRASGO, 2015). Quanto à variável bebida alcóolica, não houve significância e nem estudos com a mesma associação do polimorfismo G894T(Glu 298Asp).

Na análise das outras variáveis como cesáreas, número de gestações e número de partos na distribuição da frequência genotípica do polimorfismo G894T(Glu 298Asp), e essa frequência foi maior em pacientes nulíparas em relação as múltíparas. Esse resultado vai de encontro com os estudos de Vigano (2004) e Bellelis (2010) que relataram a dificuldade em determinar se a nuliparidade seria um fator de risco para endometriose ou se pacientes portadoras dessa doença teriam uma maior dificuldade em engravidar.

Na população geral, a distribuição genotípica observada no presente estudo mostrou-se homogênea, ou seja, todos os genótipos estiveram presentes. Porém, quando o grupo foi estratificado, o genótipo TT esteve presente apenas em mulheres inférteis reafirmando a presença desse genótipo mutado na severidade da doença. E nessa análise do genótipo

polimórfico mutado TT, as frequências genótípicas do polimorfismo G894T do gene *eNOS* obtidas nas amostras de pacientes com endometriose, corroboraram com os estudos de Zervou, (2003), que encontrou uma frequência de 40,4% do genótipo; já nos estudos de Hoon kim, (2009), a frequência foi de 1,0%, 10 (dez) vezes menor que o encontrado neste estudo (10,6%), embora os estudos desses autores tenham sido com um grupo controle e não avaliados em subgrupos de férteis e inférteis. Estudos futuros semelhantes poderão ser realizados com um número maior de indivíduos para consolidação desses resultados.

Quanto aos alelos juntos formando os genótipos, temos a hipótese de que, sendo diferentes, um deles seria um efeito protetor. Em nosso estudo, a análise dos genótipos, entre os subgrupos de férteis e inférteis, não apresentou uma diferença estatística significativa e não foi possível analisar o risco relativo devido a ausência do genótipo TT entre as pacientes férteis. Em relação à análise das frequências dos alelos polimórficos, selvagem e mutado, apresentou um importante fator de risco relativo para o desenvolvimento da infertilidade.

Na avaliação da frequência alélica, o polimorfismo T esteve presente 2,3 vezes maior em pacientes inférteis e apresentou OR 3,0 (IC 95% 1,12 – 8,29) corroborando com estudos de Hoon Kim et al., (2009), que encontraram o alelo T numa frequência duas vezes maior em pacientes coreanas com endometriose em relação a seus controles. Também Zervou et al. (2003) observou em mulheres caucasianas gregas uma frequência 3 vezes maior em relação ao grupo sem a doença. Por outro lado, no estudo

de Bhanoori, (2008), com mulheres Indianas, não foi encontrada diferença significativa.

Nos diferentes modelos de herança, a associação significativa se manteve nos modelos codominante (GG vs TT) e recessivo (TT vs GT + GG). O modelo que melhor explicou o risco para o desenvolvimento da infertilidade em pacientes com endometriose, nesse polimorfismo, foi o modelo codominante. Foram analisados indivíduos com a presença de pelo menos um alelo variante e indivíduos sem a presença do mesmo.

A presença de pelo menos um alelo de risco (T) demonstrou ser um fator de risco importante para o desenvolvimento da infertilidade na população analisada.

Existe apenas um estudo anterior desse polimorfismo e endometriose, em população grega (ZERVOU et al., 2003). Como citado, esse polimorfismo é a troca de um único nucleotídeo, mas com efeito funcional. Para a população estudada, a população variante apresenta um aumento de risco para o desenvolvimento da doença, embora não tivesse encontrado diferença estatística entre os modelos dominante, codominante e recessivo.

Devido a escassez de trabalhos sobre o polimorfismo G894T(Glu 298Asp) do gene *eNOS* na endometriose, houve uma dificuldade em discutir esses achados.

Foi demonstrado que o alelo polimórfico mutado do polimorfismo G894T(Glu 298Asp) no *eNOS* , está presente na endometriose em pacientes inférteis na população de Goiânia, estado de Goiás – Brasil, e que a presença do alelo T tem um importante papel no desenvolvimento da endometriose assim como o risco de susceptibilidade a infertilidade. Esses

resultados corroboram com estudos de Hoon Kim et al., 2009; Zervou et al., 2003 na população coreana e Grega respectivamente, embora nesses trabalhos os autores, tenham comparado o grupo com endometriose a um grupo controle.

As diferenças encontradas nas frequências codominante e recessiva do polimorfismo, contribuem para o aumento de risco da infertilidade na endometriose entre esses modelos genotípicos. Os presentes resultados são os primeiros reportados em uma população nos subgrupos de férteis e inférteis e, em conjunto com mais estudos em diferentes regiões, poderá auxiliar na elucidação do risco da presença desse alelo para o desenvolvimento da endometriose.

Apartir da análise desses resultados, fica clara a importância desse polimorfismo funcional no desenvolvimento da infertilidade em pacientes com endometriose. Assim, é importante que estudos futuros com uma amostragem populacional maior deverão ser realizados para trazer maiores esclarecimentos sobre a possível associação entre o polimorfismo G894T(Glu298Asp) do gene *eNOS* e a infertilidade na endometriose.

Como sugestão para estudos futuros, recomenda-se que seja realizado um modelo de análise entre os diversos loci de associação que poderão contribuir para uma estimativa de risco individual mais precisa no desenvolvimento dessa doença.

7 CONCLUSÕES

1- A frequência do genótipo polimórfico TT esteve presente em 10,6% das pacientes analisadas com endometriose; foi demonstrada uma maior frequência do genótipo GG em pacientes férteis com endometriose, e a frequência do genótipo TT esteve presente exclusivamente nas pacientes inférteis; as maiores frequências do genótipo GG foram observadas em pacientes férteis e inférteis brancas; nas pacientes férteis negras, o único genótipo presente foi GG; o genótipo homocigoto polimórfico TT esteve presente, exclusivamente, entre as pacientes inférteis tanto brancas quanto negras;

2- A frequência do alelo G nas pacientes férteis foi 1,3 vezes maior que nas inférteis, e a frequência do alelo polimórfico T nas pacientes inférteis foi 2,3 vezes maior do que nas pacientes férteis;

3- Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa nos modelos de expressão genotípicos recessivo e codominante, nos subgrupos de pacientes férteis e inférteis.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica utilizada foi a opção de escolha referenciada por trabalhos nacionais e internacionais, como uma forma não invasiva de auxílio ao diagnóstico.

A estocagem do material foi definida a partir de manuais de biossegurança, em baixas temperaturas, em freezer, após extração do DNA, por cinco (5) anos. Para a realização dos ensaios foram necessários testes de qualidade da amostra para maior segurança e controle. Deve-se considerar esses testes de viabilidade como sugestão para o controle de qualidade das amostras.

Estudos com maior número de amostras são necessários para confirmação dos resultados, e podem ser incluídas as análises de amostras teciduais quando possível.

Pela prevalência elevada do alelo T na população infértil analisada, sugere-se incluir o teste genético como parte do diagnóstico diferencial da severidade da endometriose.

9 REFERÊNCIAS

ABRÃO, M.S. Endometriose uma Visão Contemporânea. Rio de Janeiro: Ed. **Rev**; 2000. 1p.

ACTA MÉDICA PORTUGUESA. Endometriosis – Clinical and diagnostic Portuguese consensus recommendations. **Acta Obstet Ginecol Port**; v.10, n.2, p.162-172. 2016

AGARWAL A.; GUPTA S. AND SHARMA R. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol and Endocrinol**. v. 3, n.28, p. 2-21, 2005

ANDREUCCI, CAMILA GUIMARÃES LIMA, et al. Principais achados radiológicos de endometriose em ressonância magnética. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)** 2.3 (2014).

APLIN. A.E.; STEWART, S.A. Integrin-mediated Adhesion Regulates ERK Nuclear Translocation and Phosphorylation of Elk-1. **J of Cell Biol**. v.153, n. 2, p. 273–281, 2001.

AUGOULEA, A.; CREATSA, M. VRACHNIS, N. LAMBRINOUDAKI , I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. **Arch gynecol obstet**. v. 286, p. 99–103, 2012.

BARANOVA, H.; BOTHRISHVILLI, R.; CANIS, M.; ALBUISSON, E.; LOWACZOWER, E.; BRUHAT, M.A.; BARANOV, V.; et al. Glutathione S transferase m1 gene Polymorphism and Susceptibility to Endometriosis in a French Population. **Mol Hum Reprod**. v. 3, n. 9, p. 775-780, 1997.

BARBIERI R.L.; MISSMER S. Endometriosis: Emerging Research and Interventions Strategies in *Annals of the New York Academy of Sciences*.v.955. p. 23-33.2002.

BARBOSA, A.M. et al. Association of *CYP1A1* (cytochrome P450) *MspI* polymorphism in women with endometriosis. **Genet. Mol. Res**. v.15, n.3. 2016.

BEDONE, A.J.; MONTEIRO, I.M.U.; CANFOUR, C.C.; RIBEIRO FILHO, A.D. Correlação entre as Manifestações Clínicas e os Achados Laparoscópicos em Pacientes com Endometriose Pélvica. **Reprod**. v.9, n.4, p. 219-221, 1994.

BELLELIS, P.K.; DIAS JR, J.A., PODGAEC, S.; GONZALES, M.; BARACAT, E.C.; ABRÃO M.S. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica - uma série de casos. **Rev Assoc Med Bras**. v. 56, n.4, p. 467-71.2010.

BHANOORI, M.; KAMESHWARI, D.B.; ZONDERVAN, K.T.; DEENADAYAL, M.; KENNEDY, S. et al. The endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphism is not a risk factor for endometriosis in south Indian women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 139, p.53–58. 2008.

BURNEY, R.O., TALBI, S., HAMILTON, A.E., VO, K.C., NYEGAARD, M., NEZHAT, C.R. Gene expression. Analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis. **Endocrinol.** v. 148, p. 3814-26. 2007.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, M.D.; BARBOSA, C.P. Aspectos específicos da etiopatogenia da endometriose: Genética. In: PODGAEC, S. Coleção **Febrasgo**. Elsevier. 1.ed. Rio de Janeiro, 2015. p. 35 – 45.

BISCHOFF, F.; SIMPSON, J.L. Genetics of Endometriosis: Heritability and Candidate Genes. **Best practice & research clinical obstet and gynecol.**v.18, n. 2, p. 219-232, 2004.

BROSENS, I. Endometriosis: Ovarian Endometriosis.Tubal Infertility. **Gower medic publish**, London, p. 313-317, 1989.

BROSENS, I.; BROSENS, J.J.; FUSI, L.; KURODA, K.; AL-SABBAGH, M.; BENAGIANNO, G. Risks of adverse pregnancy outcome in endometriosis. **Fert. Steril.** v.98.p.30–5. 2012.

CAIRES, I.C. *Influencia do ciclo menstrual na fracção exalada de óxido nítrico*. 2011. 59f. Tese (Mestrado em Medicina) Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, 2011.

CHATMAN, D.L. Endometriosis in the Black Woman. **Am j obst.gynecol.** v. 125, n. 7, p. 987-989, 1976.

CHOUDHARI, S.K.et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World j of surg oncol**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

CRAMER, D.W. et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking and exercise. **JAMA.** v. 255, p. 1904-1908, 1986.

DIAS, R.G.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, M.H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arq Bras Cardiol.** v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

DUSSE L.M.S.; VIEIRA L.M.; CARVALHO M.G. Revisão sobre o óxido nítrico. **J. Bras Pat Med Lab.** V.39, n. 4, p.343-350. 2003.

FEDELLE, L.; ANCHI, S.; BOCCIOLONI, L. Pain Symptoms Associated With Endometriosis. **Obstet Gynecol.** v.79, p. 767-769. 1992.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **Manual de orientação da endometriose**. FEBRASGO, São Paulo, 2015.

FRARE, A.B.; COSTA, I.R.; SOUZA, S.R.; SILVA, R.C.P.C; BORDIN, B.M; MOURA, K.K.V.O. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in endometriosis in women from Goiás, Brazil. **Genet. Mol. Res.** v.12, n.3, p.2764-2770. 2013.

GENTILINI, D.; BUSACCA, M.; DI FRANCESCO, S.; VIGNALI, M.; VIGANO, P.; DI BLASIO, A.M. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17 β -estradiol and growth factors. **Molec Hum. Reprod.** v.13, n.5, p. 317–322, 2007.

GIORDANO, M.G. **Ginecol Endócr e da Reprod**.1.ed. São Paulo: BYK, 1998.19 p.

GIUDICI, L.C.; KAO, L. Endometriosis. *Lancet*. v. 364, p. 1789 – 99. 2004.

GOMEZ C.A; CRUZ J.C.H. Aspectos imunológicos de la endometriosis. **Ginecol. Obstet.** v.65, n.3, p. 79-86, 1997.

GREENE, R.; STRATTON, P.; CLEARY, S.D.; BALLWEG, M.L.; SINAI, N. Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. **Fertil. Steril.** v. 91, p. 32 – 39. 2009.

GREENSTEIN, B.; WOOD, D. **The endocrine system at a glance**. John Wiley & Sons, 2011.

HALIS, G.; ARICI, A. Endometriosis and inflammation in infertility. **Acad Sci.** v.1034, p.300–315. 2004.

HASSON, H.M. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. **J Reprod Med.** V.16, p. 135-138, 1976.

HOUSTON; NOLLER, K.L.; MELTON, J.; SELWYN, B.J. The Epidemiology Of Pelvic Endometriosis. **Clinic Obstet and Gynecol.** v. 31, p. 787-791.1988.

KAO, L. C. Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease Based Implantation Failure and Infertility. **Endocrinol.** v.144, n.7, p.2870–288. 2003.

KENNEDY, S.; MARDON, H.; BARLOW, D. Familial endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 12, p. 32-34, 1995.

KENNEDY, S. et al. Eshre guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Rep.**, v. 20, n. 10, p. 2698-2704, 2005.

KHAZAEI, M.; MOEIN-AFSHARI, F.; LAHER I. Vascular endothelial function in health and diseases. **Pathophysiol.** v.15, p. 49-67. 2008

KIM H., KU Y. S.; KIM H. S.; LEE H. G.; CHOI, M.Y.; KIM, M.J.; LEE, H.T.; MOON, Y.S. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism is associated with advanced stage endometriosis. **Hum Reprod.** v.00, n.0, p. 1–4, 2009.

KIRSHON, B.; POINDEXTER, A.N. Endometriosis In Multiparous Women. **The J of Reprod Med.** v.34, n.3, p. 215-217. 1989.

KNAPP VJ. How old is endometriosis ? Late 17th and 18th century European descriptions of the disease. *Fertil Steril* 1999;72:10-14.

KONINCKX P.R. Is mild endometriosis a conditions occurring intermittently in all women? **Hum Reprod.** v.9, p. 2202 – 5.1994.

KHORRAM O.; LESSEY B.A. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and $\alpha v \beta 3$ integrin in women with endometriosis. **Fertil and Steril.** v. 78, n. 4, p. 860-864, 2002.

LAPADAT R.; JOHNSON G.L. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. **Sci.** v. 298, n.5600, p. 1911-1912, 2002.

LASCHKE, M.W.; GIEBELS, C. and M.D. Menger Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. **Hum Reprod.** v.17, n..5,p. 628–636. 2011.

LAUDANSKI P. Profiling of selected angiogenesis-related genes in proliferative eutopic endometrium of women with endometriosis. **Eur J of Obstet & Gynecol and Reprod Biol.** v. 172, n.2014, p. 85–92.2013.

LESSEY, B.A.; CASTEUBAUM, A.J.; SAWIN, W.J.; BUCK, C.A.; SHINNAR, R.; BILKER, W.; STROM, B. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. **Endocr.and Metab.**v.79, n.2, p.331-372, 1994.

LIN, J.; ZONG, L.; KENNEDY, S.H.; ZONDERVAN, K.T. Coding regions of INHBA, SFRP4 and HOXA10 are not implicated in familial endometriosis linked to chromosome 7p13–15. **Molec Hum Reprod.** v.17, n..10 p. 605–611, 2011.

MAGGIORI, U.L.R.; FERRERO, S.; MANGILI, G.; BERGAMINI, A.; INVERSETTI, A.; GIORGIO,V. et al. A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. **Hum Reprod.** v. 22, n.1,p. 70–103. 2016.

MARQUES R.M. *Endometriose e Infertilidade: Revisão Sistemática da Literatura e Relato de Casos.* Monografia de Conclusão do Curso de Medicina Na Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis; 2005. 112.

MARTINI, A.C.; MOLINA, R.I.; ESTOFAN, D.; SENESTRARI, D.; FIOLE DE CUNEO, M.; RUIZ, R.D. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. **Fertil Steril**. v. 82, p.374 – 377. 2004.

MAY, K.E.; VILLAR, J.; KIRTLEY, S.; KENNEDY, S.H.; BECKER, C.M. Endometrial Alterations In Endometriosis: A Systematic Review Of Putative Biomarkers. **Hum Reprod**.v. 17, n. 5, p. 637-653, 2011.

MINICI, F.; TIBERI, F.; TROPEA, A.; ORLANDO, M.; GANGALE, M.F.; ROMANI, F.; CAMPO, S. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. **Hum Reprod**.v.3, p. 530–537. 2008

MISSMER, S.A.; HANKINSON, S.E.; SPIEGELMAN, D. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. **Obstet Gynecol**. v.104, p. 965-974. 2004.

MIYAZAWA, K. Incidence of endometriosis among japanese women. **Obstet gynecol**. v.48, p. 407-409.1976.

MOEN, M.H.; MAGNUS, P. The familial risk of endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**. v.72, p. 560-4. 1995.

MOEN M.H.; SHEI B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian country. **Acta Obstet Gynecol Scand**.; v.76, n.6, p.559-562. 1997.

MOHAN, K.; SULTANA, M. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and prolactin levels in infertile women in north Chennai, Tamilnadu. **J.Biosci. Res**, v. 1, n. 4, p. 279-284, 2010.

MOURA, M.D.; PEREIRA, T.N.; FERRIANI, R.A.; SALA, R.M.R. avaliação do tratamento clínico da endometriose. **Rev Bras Ginecol e Obste**. v. 21, n.2, 1999.

MURK W.; ATABEKOGLU C.S.; CAKMAK H.; HEPER A.; ENSARI A.; KAYISLI U.A.; ARICI A. Extracellularly Signal-Regulated Kinase Activity in the Human Endometrium: Possible Roles in the Pathogenesis of Endometriosis. **JCEM**. v. 93, n. 9, p. 3532-3540. 2008.

NAKATA, L. C. et al. Biomarcadores de susceptibilidade à endometriosis. **Rev Brasil Ginecol e Obste**., Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, 2004.

NISOLLE, M.E. Ovarianendometriosisand peritoneal endometriosis: are they differententities from a fertility perspective? **Current Opinion in Obstet and Gynecol**. 14, p. 283-288, 2002.

NISOLLE, M.E.; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril**. v 68, p. 585-596, 1997.

OLIVEIRA, R.; MUSISH, D.S.; VILARINO, F.L.; FERREIRA, M.P.S.F.; BARBOSA, C.P. Perfil Epidemiológico das pacientes com endometriose. **Reprod Clim.** v.30, n. 1, p.5 – 10.2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The epidemiology of infertility: report of a **WHO scientific group**. Geneva: 2009.

PARAZZINI, F.; LA VECCHIA, C.; FRANCESCHI, S.; NEGRI, E.; CECCHETTI, G. Risk Factors For Endometrioid, Mucinous and Serous Benign Ovarian Cysts. **Int JEpidemiol.** V.18, n.108.1989.

PARAZZINI F.; CHIAFFARINO, F.; SURACE, M. ; CHATENOU, L.; CIPRIANI, S. ; CHIANTERA, V. Selected food intake and risk of endometriosis. **Hum. Reprod.** v. 19, n.8, p.1755-1759. 2013.

PERINI, J. A.; CARDOSO, J.V.; BERARDO, P.T.; VIANNA-JORGE, R.; NASCIUTTI, L.E.; BELLODI – PRIVATO, M.; MACHADO, D.E.; ABRÃO, M.S. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G >A, +405G > C And +936C > T) in endometriosis: a case control study with brazilians. **BMC Women's Health.**,v. 14, p. 117, 2014.

PENA, S. D. J.; CARVALHO-SILVA, D. R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V. F. Retrato molecular do Brasil. **Ciê n Hoje** . v. 27, n. 159. 2000.

PODGAEC, S.; ABRÃO, M.S.; DIAS, J.A.; RIZZO, L.V.; OLIVEIRA, R.M.; BACARAT, E.C. endometriosis: na inflammatory disease with th2 immune response component. **Hum Reprod.** v. 22, p. 1373-1379, 2007.

PODGAEC, S. Tratamento da endometriose: Coleção Febrasgo. **Elsevier.** Cap.7.p.117.2015.

RAHMIOGLU, N.; NIHOLT D.R.; MORRIS, A.P.; MISSMER, S.A.; MONTGOMERY, G.W.; ZONDERVAN, K.T. Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. **Hum Reprod.**,v. 20, p. 702-716, 2014.

RAHAL, A. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Bio Med Res Intern.** v. 2014, p. 19. 2014.

RAMPINELLI, H.; MILANESE, B.C.; MADEIRA, K. Perfil epidemiológico das pacientes atendidas em um consultório privado e submetidas à videolaparoscopia para tratamento de endometriose na região de Criciúma. **Arq Catarin Med.** v. 42; n.2, p. 09-14. 2013.

RANNEY, B. Endometriosis IV: hereditary tendency. **Obstet. Gynecol.**, v. 37, p. 734-737, 1971.

REDE LATINO-AMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA Chile, 2008. Disponível em: http://www.redlara.com/aa_portugues/registro .asp. acesso em: 13/10/2016.

RIBEIRO JÚNIOR, C. L. et al. Analysis of P53 codon 72 gene polymorphism in brazilian patients with endometriosis. **Genet. Mol. Res**, v. 8, n. 2, p. 494-499, 2009.

ROKITANSKY, C. V. Über uterusdrüsen-neubildung in uterus-und ovarial-sarcomen. (on the neoplasm of uterus glands on uterine and ovarian sarcomas). **Zeitschr Ges Aerzte Wien**, v. 1, n. 27, p. 577–581, 1860.

ROUX P.P.; BLENIS J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**v. 68, n. 2, p. 320-344. 2004.

SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 14, p. 422-469. 1927.

SANTIAGO, K. *Polimorfismos genéticos em pacientes de Goiânia com endometriose: Um estudo analítico*. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Genética MGENE da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética. 2013.94p.

SHOR E. P27^{Kip1} is down-regulated in the endometrium of women with endometriosis. **Elsevier**. v.91, n.3, p. 682-686. 2009.

SILVA, R.C.P.C.; COSTA I.R.; BORDIN B.M; SILVA C.T.X.; SOUZA S.R.; JÚNIOR C.L.R.; FRARE A.B.; MOURA K.K.V.O.. RsaI polymorphism of the Reβ gene in women with Endometriosis. **Genet. Mol. Res.**,v. 10, n. 1, p. 465-470, 2011.

SILVA, R.C.P.C; MOURA K.K.V.O; JÚNIOR C.L.R; GUILLO, L.A. Estrogen signaling in the proliferative endometrium: implications in endometriosis. **Rev Assoc Med Bras**. v. 62, n.1,p.72-77. 2016

SINAI, N.; PLUMB B.K.; COTTON,L.; LAMBERT,A.; KENNEDY, S.; ZONDERVAN, K.; STRATTON,P. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. **Fert and Steril**,v. 89, n. 3, p. 538-545, 2008.

TAGUCHI, M.; ALFER, J.; BEIER, H.M.; CLASSEN, L.. Endothelial nitric oxide synthase is differently expressed in human endometrial vessels during the menstrual cycle. **Mol hum reprod**. v.6, n. 2, p. 185-190, 2000

TEMPFER, C.B.; UNFRIED, G.; NAGELE, F.; HUBER, J. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism in Women with Idiopathic Recurrent Miscarriage. **Fert. Steril**. v. 74, n.1, p. 33-34,2000.

TEMPFER, C. B.; SIMONI, M.; DESTENAVES, B.; FAUSER, B.C. Functional genetic polymorphisms and Female reproductive disorders: part II. **Endometriosis Hum Reprod update**, v.15, n. 1, p. 97-118, 2009.

THOMAS, E. J. Endometriosis: confusion or sense? **J Ginecol Obstet.** v. 48, n. 2, p. 149-155, 1995.

TRELOAR, S. A.; O'CONNOR, D. T.; O'CONNOR, V. M. Genetic influences on endometriosis in a australian twin sample. **Fertil and Steril**, v. 71, n. 4, 1999.

TRUMMER, H.; HABERMANN, H.; HAAS, J.; PUMMER, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. **Hum Reprod.** v.17, n.6, p.1554-9. 2002

VELARDE M.C.; AGHAJANOVA L.;NEZHAT C.R.; GIUDICE L.C. Increased Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/Extracellularly Regulated Kinase Activity in Human Endometrial Stromal Fibroblasts of Women with Endometriosis Reduces 3',5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Inhibition of Cyclin D1. **Endocr.** v. 150, n. 10, p. 3697-4085, 2009.

VELEBIL, P. Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in The United States. **Obstet. Gynecol.**,v. 86, n. 5, p. 764-769, 1995.

VIGANO, P. et al. Deficient antiendometrium lymphocyte-mediated cytotoxicity in patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 56, p. 894-899, 1991.

VIGANO, P.; PARAZZINI F.; SOMIGLIANA, E.; VERCELLINI, P. Endometriosis, epidemiology, aetiology factors. **Clin Obstet Gynecol.** v.18, p.187-200.2004.

VIGANO, P.; SOMIGLIANA, E.; VIGNALI, M.; BUSACCA, M.; BLASIO, A.M. Genetics of endometriosis: current status and prospects. **Front Biosci.** v. 12, p. 3247–3255. 2007

VITONIS, A.F.; HANKINSON, S.E.; HORNSTEIN, M.D.; MISSMER, S.A. adult physical activity and endometriosis risk. **Epidemiol.** v. 21, n. 1, p. 16-23, 2010.

Wang, L.; Wang, X.; Wang, W. et al. Stress and dysmenorrhoea: a population based prospective study. **Occup. Environ. Med.** 611021-1026. 2004.

WENZL, R.; KIESEL, L.; HUBER, J.C. & WIESER, F. Endometriosis: a genetic disease. **Drugs of Today**, v.39, p. 961–972. 2003

WHEELER, J. M. Epidemiology of endometriosis – associated infertility. **J Reprod. Med.**, v. 34, p. 41-46, 1989.

WORLEY JR, M.J.; WELCH, W.R.; BERKOWITZ, R.S.; SHU-WING, N.G. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: A Review of Pathogenesis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 5367-5379. 2013.

WU, M. Y.; CHAO, K. H.; YANG, J. H.; LEE, T. H. YANG, Y. S.; HO, H. N. Nitric oxide synthesis is increased in the endometrial tissue of women with endometriosis. **Hum. Reprod.** v. 18, n. 12, p.2668-71. 2003.

WU Y.; KAJDACSZY-BALLA A.; STRAWN E.; BASIR Z.; HALVERSON G.; JAILWALA P.; WANG Y.; WANG X.; GHOSH S.; GUO S.W. et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. **Endocrinol.** v.147, p. 232–246. 2006

YÁNEZ, R. Y.; GONZÁLEZ, M. M. Endometriosis: fisiopatología y líneas de investigación. **Ginecol Obstet Mex.**, v. 75, n. 8, p. 477-483, 2007.

YAMAUCHI, N.; HARADA, T.; TANIGUCHI, F.; YOSHIDA, S.; IWABE, T.; TERAOKA N. Tumor necrosis factor-alpha induced the release of interleukin-6 from endometriotic stromal cells by the nuclear factor-kappaB and mitogenactivated protein kinase pathways. **Fertil Steril.** v.82, p.1023–1028. 2004

YEO, S. G.; WON, Y.S.; LEE, H.Y.; KIM, Y.II.; LEE, J.W.; PARK, D.C. Increased Expression of Pattern Recognition Receptors and Nitric Oxide Synthase in Patients with Endometriosis. **Int. J. Med. Sci.**, v.10. 2013.

YOSHINO, O.; OSUGA, Y.; HYROTA, Y.; KOGA, K.; HIRATA, T.; HARADA, M. et al. Possible Pathophysiological Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) in Endometriosis. **Am J. of Reprod Immunol.** v.52, n.5,p.306-311.2004.

YOTOVA, I.Y.; QUAN, P.; LEDITZNIG, N.; BEER, U.; WENZL, R.; TSCHUGGUEL, W. Abnormal activation of Ras/Raf/MAPK and RhoA/ROCKII signalling pathways in eutopic endometrial stromal cells of patients with endometriosis. **Hum Reprod.** v.26, n..4, p. 885–897. 2011.

XAVIER, P.A.F. Apoptose e Reprodução Humana. **Acta Méd Portuguesa.** v.15, p. 287-291.2002.

ZERVOU, S.; KARTERIS, E.; GOUMENOU, A.G.; VATISH, M.; KOUMANTAKIS, E.E.; HILLHOUSE, E.W. The Glu2983Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with endometriosis. **Fertil. Steril.** v. 80, n. 6, p. 1524 -25. 2003

Apêndice 1 – Apresentação de tabelas

Apresentação das tabelas de análises dos dados clínicos relatadas nos resultados.

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e a cor da pele. Goiânia – Goiás. 2016

Queixa principal	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Branca	22	92	24	86	46	88,5
Negra	2	8	4	14	6	11,5
Total	24	100	28	100	52	100

$\chi^2 = 0,449$ $p = 0,503$.

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e demais sintomas relatados em Goiânia – Goiás. 2016

Demais sintomas	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Sem relatos	12	50	0	0	12	23,1
Dor pélvica	0	0	12	43	12	23,1
Dor pélvica intensa	0	0	10	35,7	10	19,2
Sangramento	9	37,5	0	0	9	17,3
Sangramento e dor pélvica	0	0	4	14,3	4	7,7
Endometrioma	3	12,5	0	0	3	5,8
Endometrioma e dor pélvica intensa	0	0	2	7,0	2	3,8
Total	24	100	28	100	52	100

$\chi^2 = 18,20$ $p < 0,0001$. Para o cálculo, devido ao grande número de valores iguais a zero, as variáveis foram agrupadas.

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e a duração dos sintomas relatados em Goiânia – Goiás. 2016.

Duração dos sintomas (anos)	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
0 — 3	13	54	9	33	22	43
3 — 6	8	33	15	56	23	45
6 — 8	3	13	3	11	6	12

Total	24	100	27*	100	51	100
-------	----	-----	-----	-----	----	-----

$\chi^2 = 2,69$, $p < 0,260$; * 1 paciente sem informação

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e o período do ciclo onde os sintomas aparecem em Goiânia – Goiás. 2016.

Período do ciclo menstrual	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Pré-menstrual	1	4,2	7	26	8	16
Pré e menstrual	14	58,3	5	18,5	19	37
Todo o período menstrual	9	37,5	15	5,5	24	47
Total	24	100	27*	100	51	100

$\chi^2 = 10,12$ $p = 0,006$; * 1 paciente sem informação

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e o grau de classificação da endometriose em Goiânia – Goiás. 2016.

Classificação (grau)	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
I	4	17	7	26	11	22
II	7	29	4	15	11	22
III	8	33	11	41	19	37
IV	5	21	5	18,5	10	19,6
Total	24	100	27*	100	51	100

$\chi^2 = 1,94$ $p = 0,585$; * 1 paciente sem informação

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e a intensidade de atividade física praticada em Goiânia – Goiás. 2016.

Atividade física (intensidade percebida)	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Não pratica	7	29,2	11	41	18	35
Leve	14	58,3	9	33	23	45
Moderada	3	12,5	7	26	10	20
Total	24	100	27*	100	51	100

$\chi^2 = 3,41$ $p = 0,192$; * 1 paciente sem informação

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e o hábito de fumar em Goiânia – Goiás. 2016.

Fumo	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Não fuma	23	96	25	92,5	48	94
Sim	1	4	2	7,5	3	6
Total	24	100	27*	100	51	100

$\chi^2 = 0,2410$ $p = 0,623$; *1 paciente sem informação

Distribuição das pacientes com endometriose segundo a condição de fertilidade e o hábito de beber em Goiânia – Goiás. 2016.

Alcool	Condição de Fertilidade				Total	
	Sim		Não			
	n	%	n	%	n	%
Não	21	87,5	25	92,5	46	90
Sim	3	12,5	2	7,5	5	10
Total	24	100	27*	100	51	100

$\chi^2 = 0,3726$ $p = 0,542$; *1 paciente sem informação

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto às queixas principais em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						p
	GG(n=28)		GT(n=14)		TT(n=5)		
Queixas Principais	n	%	n	%	n	%	
Dor Pélvica	10	35,7	5	35,7	—	0,0	0,220
Dor Pélvica Intensa	6	21,4	2	14,3	—	0,0	
Infertilidade	12	42,9	7	50,0	5	100,0	

Valor de **p** calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto aos demais sintomas em Goiânia – Goiás. 2016.

Variáveis	eNOS						p
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
	n	%	n	%	n	%	
Demais Sintomas							
Dor Pélvica	3	10,7	3	21,4	4	80,0	
Dor Pélvica Intensa	7	25,0	1	7,1	–	–	
Sangramento	5	17,9	3	21,4	–	–	0,119
Sangramento+ Dor Pélvica	2	7,1	1	7,1	–	–	
Endometrioma	2	7,1	2	14,3	–	–	
Dor Pélvica+ Endometrioma	–	0,0	1	7,1	1	20,0	
Nenhum	9	32,1	3	21,4	–	–	

Valor de **p** calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto a duração dos sintomas em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						P
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
	n	%	n	%	n	%	
Duração dos sintomas							
0 — 3	11	39,3	9	64,3	1	20,0	
3 — 6	12	42,9	5	35,7	2	40,0	0,326
6 — 8	5	17,9	-	0,0	1	20,0	
Sem informação	-	0,0	-	0,0	1	20,0	

Valor de **p** calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto ao período do ciclo menstrual em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						P
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
	n	%	n	%	n	%	
Período do ciclo							
Pré-menstrual	4	14,3	2	14,3	—	0,0	
Pre + menstrual	11	39,3	6	42,9	2	40,0	0,967
Todo	13	46,4	6	42,9	2	40,0	
Sem informação	-	0,0	-	0,0	1	20,0	

Valor de **p** calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto ao grau de classificação segundo a “American Fertility Society” em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						P
	GG (n = 28)		GT (n = 14)		TT (n = 5)		
Classificação	n	%	n	%	n	%	
Grau I/II	12	42,8	5	35,7	1	20,0	0,058
Grau III/IV	16	57,1	9	64,3	3	60,0	
Sem Informação	–	–	–	–	1	20,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto o hábito de atividade física em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						P
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
Atividade Física	n	%	n	%	n	%	
Não	9	32,1	7	50,0	1	20,0	0,546
Sim Leve	13	46,4	5	35,7	3	60,0	
Sim Moderada	6	21,4	2	14,3	-	-	
Sem informação	-	0,0	-	0,0	1	20,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto o hábito de fumar em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						p
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
Fuma	n	%	n	%	n	%	
Sim	1	3,6	2	14,3	–	0,0	0,577
Não	27	96,4	12	85,7	4	80,0	
Sem Informação	–	0,0	–	0,0	1	20,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto o hábito de uso de bebida alcóolica em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						p
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
Álcool	n	%	n	%	n	%	
Sim	3	10,7	2	14,3	—	0,0	0,720
Não	25	89,3	12	85,7	4	80,0	
Sem Informação	—	0,0	—	0,0	1	20,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto ao número de gestações em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNos						P
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
Nº Gestações	n	%	n	%	n	%	
0	12	42,9	7	50,0	5	100	0,209
1	10	35,7	6	42,9	—	0,0	
2	6	21,4	1	7,1	—	0,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição genotípica do polimorfismo do gene eNOS nas pacientes com endometriose quanto ao número de partos em Goiânia – Goiás. 2016.

Variável	eNOS						P
	GG (n=28)		GT (n=14)		TT (n=5)		
N. Partos	n	%	n	%	n	%	
0	12	42,9	7	50,0	5	100	0,209
1	9	32,1	6	42,9	—	0,0	
2	6	21,4	1	7,1	—	0,0	

Valor de *p* calculado pelo teste do χ^2

Distribuição da frequência genotípica nas amostras de pacientes com diagnóstico de endometriose em subgrupos de pacientes férteis e inférteis em Goiânia – Goiás. 2016.

Subgrupos	eNOS						P
	GG (n=28)		GT(n=14)		TT (n=5)		
	n	%	n	%	n	%	
Férteis	16	57,1	7	50,0	0	0,0	0,062
Inférteis	12	42,8	7	50,0	5	100,0	

Valor de *p* foi calculado pelo teste do χ^2

Apêndice 2

QUESTIONÁRIO

-Nome:

-Data de nascimento: / / . – Cor de pele:

-Endereço:

-Telefones:

-Queixa principal:

- Demais sintomas:

- Duração:

- Período do ciclo: ciclo todo (); dor do meio do ciclo (); dor pré-menstrual ()

- Hábitos de vida:

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

→ Fumo () álcool ()

→ Uso de Anticoncepcional ou contraceptivo: não () sim().

➤ Há quanto tempo.....

➤ Qual esquema.....

➤ Ocorre melhora da dor com ACO: não (); sim e parcial (); melhora completa ().

- Ritmo sexual: () vezes por semana.

- Paridade: gesta () para () aborto () cesariana ()

Idade dos filhos:

-Filhos () não

-Deseja engravidar () sim () não

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

Pesquisador:

- RESULTADO

ANATOMO-PATOLÓGICO:

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

Anexo 2 – TCLE

Anexo 3 – Anamnese

Anexo 4 - Normas de publicação dos respectivos periódicos

Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética

numero 0126.0.168.000-08.

Figura de Print da página SISNEP:

Título do Projeto de Pesquisa

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	07/11/2008 09:01:13	23/03/2009 17:18:48		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	12/10/2008 00:18:10	Folha de Rosto	FR224472	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	07/11/2008 09:01:13	Folha de Rosto	0126.0.168.000-08	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	23/03/2009 17:18:48	Folha de Rosto	1068	CEP

ANEXO 2
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 Federal de Goiás

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Análise de marcadores genéticos específicos para mulheres com endometriose

Coordenador Responsável:

Telefones para contatos:

Eu abaixo qualificado, após ser esclarecida verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: **Análise de marcadores genéticos específicos para mulheres com endometriose** realizadas pelo Núcleo de Pesquisa da Universidade Federal de Goiás em associação com o Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

DECLARO assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente que o trabalho consiste

na análise molecular de amostras de sangue, e resposta de um questionário, mantendo o objetivo de complementar o meu diagnóstico e de pesquisa. A biomédica Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva irá coletar meu sangue **(10ml de sangue venoso)**, e este material será utilizado para analisar **diferentes genes associados a endometriose para identificar um candidato a diagnóstico precoce de endometriose associado ou não a infertilidade.**

DECLARO que compreendi que a obtenção das amostras citadas acontecerá sob minha total ciência, e sob os procedimentos adequados pela equipe responsável pela pesquisa, sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim, e que **todo material biológico, os dados genéticos e os do questionário** serão descartados após a utilização na pesquisa e **que eu posso retirá-los a qualquer momento.** 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, **ressalvando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa.**

O risco a que me submeto ao coletar sangue venoso periférico é de hematomas e que caso ocorra o mesmo será atendido pelo profissional responsável pela coleta no local da pesquisa. Eu poderei ser ressarcida de despesas caso a mesmas ocorram.

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

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

ANEXO 3:

Anamnese Específica

1- Nome: _____

2- Registro: _____ 3- Telefone: _____

4- Idade na época do diagnóstico: _____ anos 5- Raça: _____

6- Idade da menarca: _____ 7- Paridade: _____ 8- Gestações: _____

9- Abortamento: _____

10- Principal sintoma na época do diagnóstico: () Infertilidade () dor a menstruação () Dor pélvica () Dor a relação sexual () Outras () Sintomas urinários () Sangramento menstrual Anormal () Sintomas gástricos

11- Doenças associadas na época do diagnóstico: _____

12- Diagnóstico da cirurgia: () Endometriose () DIP () Sem doença

13- Grau da endometriose: () mínima (I) () Leve (II) () moderada (III) () Severa (IV)

14- Resultado da patologia comprova endometriose: () Sim () Não

15- Familiares com endometriose: () Não () Sim. quem? _____

16- História familiar de câncer de ovário, mama e/ou linfoma? () Sim () não () Outros. _____

17- Renda familiar: () até 2 salários mínimos () 3 a 6 salários mínimos () acima de 6 salários mínimos.

18- Idade na época do início dos sintomas: _____ anos

19- Números de médicos que a assistiram antes do diagnóstico: _____

20- No caso de gravidez, complicações pré-natais: _____

21- Usou Anticoncepcional? () não () Sim. Houve melhora dos sintomas? () Sim () Não

22 – Usou AINES? () Não () Sim. Houve melhora dos sintomas? () Sim () Não.

ANEXO 4 - Normas da revista RAMB/Normas da revista GMR

Normas de publicação dos respectivos periódicos



Revista da Associação Médica Brasileira
Journal of the Brazilian Medical Association

ISSN 0104-4230 *versão impressa*
ISSN 1806-9282 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivo e política editorial](#)
- [Informações gerais](#)

Informações gerais

Como submeter artigos

Os artigos e correspondências deverão ser enviados somente via internet pelo seguinte endereço eletrônico: www.ramb.org.br. Basta a realização de um cadastro, seguido do envio do manuscrito, obedecendo as normas aqui descritas. Só serão aceitos artigos que, dentre seus autores, contenha, no mínimo, um médico.

Os artigos poderão ser escritos em português, espanhol ou na língua inglesa. Cada artigo, acompanhado de correspondência ao editor, deverá conter título, nome completo do(s) autor(es), instituição na qual o trabalho foi realizado e seção da revista à qual se destina.

O conteúdo do material enviado para publicação na RAMB não pode estar em processo de avaliação, já ter sido publicado, nem ser submetido posteriormente para publicação em outros periódicos. A critério do editor chefe, todos os artigos recebidos são revisados por membros do Conselho Editorial.

Ao preparar o manuscrito, os autores deverão indicar qual ou quais áreas editoriais estão relacionadas ao artigo, para que este possa ser encaminhado para análise editorial específica.

O Conselho Editorial recomenda que os autores façam uma busca por artigos relacionados ao tema e publicados anteriormente na RAMB ou em outros periódicos indexados no SciELO, utilizando as mesmas palavras-chaves do artigo proposto. Estes artigos devem ser considerados pelos autores na elaboração do manuscrito com o objetivo de estimular o intercâmbio científico entre os periódicos SciELO.

O que acontece depois que o artigo foi submetido

Em virtude do grande número de artigos enviados, o Conselho Editorial adotou critérios de seleção para o

processo de revisão por pares. A exemplo do que acontece com outros periódicos, a maior parte dos artigos submetidos não passa para a fase detalhada de avaliação que é a revisão por pares. Os critérios que o Conselho Editorial adotou para essa seleção inicial incluem o perfil editorial da revista e de seus leitores, área de interesse do tema principal do trabalho, título e resumo adequados, redação bem elaborada, metodologia bem definida e correta (incluindo, no caso de estudos clínicos, tamanho amostral, metodologia estatística e aprovação por Comitê de Ética), resultados apresentados de maneira clara e conclusões baseadas nos dados. Esse procedimento tem por objetivo reduzir o tempo de resposta e não prejudicar os autores. A resposta detalhada, elaborada pelos revisores, só ocorre quando o artigo passa dessa primeira fase.

No caso de rejeição, a decisão sobre a primeira fase de avaliação é comunicada aos autores em média duas a três semanas depois do início do processo (que começa logo após a aprovação do formato pelo revisor de forma). O resultado da revisão por pares contendo a aceitação ou a rejeição do artigo para publicação ocorrerá no menor prazo possível.

Embora existam rigorosos limites de tempo para a revisão por pares, a maioria dos periódicos científicos conta com o notável esforço e a colaboração da comunidade científica que, por ter muitas outras atribuições, nem sempre consegue cumprir os prazos. Ao receber o parecer dos revisores, os autores deverão encaminhar, em comunicado à parte, todos os pontos alterados do artigo que foram solicitados pelos revisores. Além disso, o texto contendo as alterações solicitadas pelos revisores deverá ser reencaminhado à RAMB na cor vermelha, devendo ser mantido e sublinhado o texto anterior.

A ordem de publicação dos artigos será cronológica, podendo, no entanto, haver exceções definidas pelo Conselho Editorial. Os trabalhos aceitos para publicação serão enviados aos autores e deverão ser revisados e devolvidos no prazo de dois dias, caso contrário o artigo será publicado em sua forma original. Após a aprovação final pelos autores NÃO será possível modificar o texto.

CORPO EDITORIAL

O Corpo Editorial da RAMB é composto pelo Editor Geral, Editores Associados, Editores Colaboradores e Conselho Editorial nas seguintes áreas: Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, Saúde Pública, Pediatria, Ginecologia e Obstetrícia, Bioética, Cancerologia, Emergência e Medicina Intensiva, Medicina Farmacêutica e Medicina Baseada em Evidências. O Corpo Editorial será responsável pela revisão e aceitação ou não dos artigos

enviados à revista para publicação. O editor-chefe tem as prerrogativas que o cargo lhe confere para aceitar ou não qualquer artigo, independentemente da revisão por pares, assim como definir a edição de sua publicação.

Estilo e preparação de originais

O trabalho deverá ser redigido em corpo 12, no máximo em 15 laudas de 30 linhas cada, espaço 1,5 linha, com margem de 3 cm de cada lado, no topo e no pé de cada página. Todas as páginas, excluída a do título, devem ser numeradas.

Página título

Deverá conter:

- a) O título do trabalho, também na versão em inglês, deverá ser conciso e não exceder 75 toques ou uma linha.
- b) Nome, sobrenome do autor e instituição a qual pertence o autor.
- c) Nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado.
- d) Carta de apresentação, contendo assinatura de todos os autores, responsabilizando-se pelo conteúdo do trabalho, porém apenas um deve ser indicado como responsável pela troca de correspondência. Deve conter telefone, fax, e-mail e endereço para contato.
- e) Aspectos éticos: carta dos autores revelando eventuais conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos) que possam influenciar ou ter influenciado os resultados da pesquisa ou o conteúdo do trabalho. Na carta deve constar ainda, quando cabível, a data da aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição à qual estão vinculados os autores. É absolutamente obrigatório o envio, juntamente com o artigo, do termo de copyright, disponível no site da Ramb, devidamente assinado pelos autores, sem o qual o artigo não seguirá o seu fluxo normal de avaliação

Tópicos dos artigos

Os artigos originais deverão conter, obrigatoriamente, Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

Notas de rodapé

Apenas quando estritamente necessárias; devem ser assinaladas no texto e apresentadas em folha separada após a do resumo, com o subtítulo "Nota de rodapé".

AGRADECIMENTOS

Apenas a quem colabore de modo significativo na realização do trabalho. Deve vir antes das referências bibliográficas.

RESUMO/SUMMARY

O resumo, com no máximo 250 palavras, deverá conter objetivo, métodos, resultados e conclusões. Após o resumo deverão ser indicados, no máximo, seis Unitermos (recomenda-se o vocabulário controlado do DeCS – Descritores em Ciências da Saúde, publicação da BIREME – Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde). Para os termos em inglês recomenda-se o MeSH da base Medline. O Summary visa permitir a perfeita compreensão do artigo. Apresentar em folha separada e seguir o mesmo modelo do resumo: background, methods, results, conclusions. Deve ser seguido de keywords.

Artigos escritos em português devem conter, na segunda página, dois resumos: um em português e outro em inglês (Summary). Artigos escritos em espanhol devem apresentar resumos em inglês (Summary) e português. Os escritos em inglês devem conter resumo também em português.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas devem ser dispostas por ordem de entrada no texto e numeradas consecutivamente, sendo obrigatória sua citação. Devem ser citados todos os autores, totalizando seis; acima deste número, citam-se os seis primeiros seguidos de et al. O periódico deverá ter seu nome abreviado de acordo com a LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS do ano corrente, disponível também on-line nos sites: www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html ou www.nlm.nih.gov/citingmedicine ou, se não for possível, a Associação de Normas Técnicas (ABNT). Exemplos:

1. Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.
2. Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.
3. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164:282-4.
4. Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.
5. Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995.p.465-78.
6. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from:

URL: www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm.

7. Leite DP. Padrão de prescrição para pacientes pediátricos hospitalizados: uma abordagem farmacoepidemiológica [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

Referências de "resultados não publicados" e "comunicação pessoal" devem aparecer, entre parênteses, seguindo o(s) nome(s) individual (is) no texto. Exemplo: Oliveira AC, Silva PA e Garden LC (resultados não publicados). O autor deve obter permissão para usar "comunicação pessoal".

CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

As citações bibliográficas no texto devem ser numeradas com algarismos arábicos sobrescritos, na ordem em que aparecem no texto. Exemplo: Até em situações de normoglicemia⁶.

FIGURAS, TABELAS, GRÁFICOS, ANEXOS

No original deverão estar inseridos tabelas, fotografias, gráficos, figuras ou anexos. Devem ser apresentados apenas quando necessários, para a efetiva compreensão do texto e dos dados, totalizando no MÁXIMO TRÊS.

- a) As figuras, sempre em preto e branco, devem ser originais e de boa qualidade. As letras e símbolos devem estar na legenda.
- b) As legendas das figuras e tabelas devem permitir sua perfeita compreensão, independente do texto.
- c) As tabelas, com título e legenda, deverão estar em arquivos individuais.
- d) É preciso indicar, em cada figura, o nome do primeiro autor e o número da figura. Figuras e tabelas deverão ser numeradas separadamente, usando algarismo arábico, na ordem em que aparecem no texto.

ABREVIÇÕES/NOMENCLATURA

O uso de abreviações deve ser mínimo. Quando expressões extensas precisam ser repetidas, recomenda-se que suas iniciais maiúsculas as substituam após a primeira menção. Esta deve ser seguida das iniciais entre parênteses. Todas as abreviações em tabelas e figuras devem ser definidas nas respectivas legendas. Apenas o nome genérico do medicamento utilizado deve ser citado no trabalho.

TERMINOLOGIA

Visando o emprego de termos oficiais dos trabalhos publicados, a RAMB adota a Terminologia Anatômica

Oficial Universal, aprovada pela Federação Internacional de Associações de Anatomistas (FIAA). As indicações bibliográficas para consulta são as seguintes: FCAT – IFAA (1998) – International Anatomical Terminology – Stuttgart – Alemanha – Georg Thieme Verlag , Editora Manole.

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Associação Médica Brasileira
R. São Carlos do Pinhal, 324
01333-903 São Paulo SP - Brasil
Tel.: +55 11 3178-6800
Fax: +55 11 3178-6816



ramb@amb.org.br



Submit your manuscript

Are you ready to submit your manuscript? Please review the submission guidelines and

then refer to this checklist to ensure that you have gathered all the relevant information and that

the manuscript is properly formatted.

All manuscripts must be submitted using the online submission system.

If you are sure whether your work satisfies the basic requirements for publication in GMR,

we are happy to consider your paper.

Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by

e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one

week, the author should contact the editor at [\[gmr@geneticsmr.com\]](mailto:gmr@geneticsmr.com).

Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged

to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To

facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted

but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

Article processing charge

To provide Open Access, GMR uses a business model to offset expenses - including

those of peer review management, journal production, and online hosting and archiving - by article-

processing charge to the authors, institutions, or funders for each article published.

The article-processing fee applied by GMR consists of: Submission Fee + Publication Fee.

Read more

about submission fee and publication fee.

Authors' list

Are all authors aware of, and do they approve of, the submission of the manuscript, its

content, authorship, and the order of authorship?

Do you have the following information for all authors?

First Name, Middle Names/Initials, Last Name

Work Affiliations

Email Address

Any Competing Interests

Financial Disclosure/Funding Information

All authors signed the
cover letter

Genetics and Molecular Research - ISSN: 1676-5680

Rua Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista - Ribeirão Preto/SP -
Brasil

Fone: +55 (16) 3620 1251 - Fax: +55 (16) 3621 1991