

**CÍNTIA MEIRELLES DE CAMARGO-KOSUGI**

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *P27* e *FAS* EM  
MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção de Título de  
Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**CÍNTIA MEIRELLES DE CAMARGO-KOSUGI**

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *TP53*, *P27* E *FAS* EM  
MULHERES COM ENDOMETRIOSE**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para obtenção  
de Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Schor

São Paulo

2009

Camargo-Kosugi, Cíntia Meirelles de

**Avaliação dos polimorfismos nos genes *TP53*, *P27* e *FAS* em mulheres com endometriose** / Cíntia Meirelles de Camargo-Kosugi -- São Paulo, 2008. xiv, 44f.

Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Evaluation of *TP53*, *P27* and *FAS* polymorphism genes and endometriosis.

1. Endometriose. 2. Polimorfismo genético. 3. Gene *TP53*. 4. Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina *P27*. 5. *FAS*.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:**

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido **EDUARDO MACOTO KOSUGI**,  
luz da minha vida, por todo amor, carinho, respeito, atenção e dedicação. É  
indescritível o quanto aprendo com você todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. ISMAEL DALE COTRIM GUERREIRO DA SILVA, pelo apoio, paciência, pelos ensinamentos que não tem preço e pela amizade.

Ao Prof. Dr. EDUARDO SCHOR, pela preciosa co-orientação, apoio, respeito e, principalmente, paciência.

Ao meu querido marido Dr. EDUARDO MACOTO KOSUGI, pela perfeição imperfeita, pelo amor infinito, pela graça que dá a minha vida.

Às queridas ANA MARIA DE OLIVEIRA TABORDA e ELENIR MONTEIRO DE SANTANA PEREIRA, parte da minha família aqui em São Paulo, pelo carinho, cuidado e excelentes conselhos a mim dispensados durante todo o trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: JÉSSICA, DANIELA LEITE, MICHELLE JUNQUEIRA, NAIARA, PAULO D'AMORA, BEATRIZ, CRISTINA, ÉRICA, JOÃO PAULO, GABRIELA, TATIANA, DANIELA VIDOTTI, CECÍLIA E MICHELLE ZAMPIERI, por todo o apoio e ajuda a mim dispensados.

Às queridas MARGARET GORI MOURO e DONA NEIDA, do Departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo carinho, atenção e apoio nas horas de desespero.

Às funcionárias da Disciplina de Ginecologia Molecular da UNIFESP-EPM, KARIM M. DOS SANTOS e ZÉLIA M. G. DE MACEDO, pela atenção, cuidados e inúmeros favores prestados.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO E APOIO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP – pela concessão da bolsa de mestrado.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

À minha avozinha amada, querida ANTONIA MARIA DE MEIRELLES pela ajuda nas horas difíceis, pelo amor de avó, de mãe e de santa.

Aos meus pais, LUIZ CARLOS CAMARGO E CLEUSA APARECIDA DE MEIRELLES CAMARGO por fazerem viável a minha estada aqui e agora, pelos ensinamentos e formação de caráter, educação, compaixão.

Aos queridos irmãos JULIANA MEIRELLES CAMARGO MENDES e MICHAEL MENDES, RENATO MEIRELLES CAMARGO e TALITA CAMARGO, por todo o amor, carinho e admiração a mim depositados.

Aos meus sogros-pais ANTONIO KOSUGI e FUMIKO KOSUGI pelo amor de verdadeiros pais, pelo apoio e carinho durante todos esses anos.

Aos meus tios: WANILDA BAPTISTA DE MEIRELLES; CLEIDE DE MEIRELLES RODRIGUES e DAVID RODRIGUES; FÁBIO GILMAR DE MEIRELLES e DELMIRA AUGUSTO DE MEIRELLES; FLÁVIO GILMAR DE MEIRELLES e ISABEL CRISTINA DE MEIRELLES e MÁRIO CAMARGO pelo carinho e atenção, pois todos participaram, de alguma forma, para o meu crescimento pessoal e profissional – existe um pouco de vocês dentro de mim e na pessoa que sou. Muito obrigada!

Aos meus falecidos avós GERALDO BAPTISTA DE MEIRELLES; ANTONIA MORAES DE CAMARGO; BENEDITO CAMARGO.

Aos meus queridos primos MARIANA, MARINA, WILLIAM E GABRIELA.

Aos amigos: CASSIANA TAMI KONISHI, EKTOR TSUNEO ONISHI, VIRGÍNIA DOM PEDRO ZANIN SUGURI, VINÍCIUS MAGALHÃES SUGURI, JÉSSICA VIDAL ROJAS.



# ÍNDICE

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Listas.....	ix
Resumo.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	7
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	33
Anexos	
Abstract	
Bibliografia consultada	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 11.....	13
Tabela 2.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 11.....	13
Tabela 3.	Distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 11.....	14
Tabela 4.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 72.....	15
Tabela 5.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 72.....	16
Tabela 6.	Distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 72.....	16
Tabela 7.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 248.....	18
Tabela 8.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 248.....	18
Tabela 9.	Distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>TP53</i> – códon 248.....	18
Tabela 10.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	19
Tabela 11.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	20

Tabela 12.	Distribuição alélica do polimorfismo no gene <i>P27</i> .....	21
Tabela 13.	Distribuição genotípica do polimorfismo no gene <i>FAS</i> .....	23
Tabela 14.	Distribuição alélica do polimorfismo no gene <i>FAS</i> .....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo no gene <i>TP53*11</i> .....	14
Figura 2.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>TP53*72</i> .....	15
Figura 3.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>TP53*72</i> .....	16
Figura 4.	Gráfico de distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>TP53*72</i> .....	17
Figura 5.	Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo no gene <i>TP53*72</i> .....	17
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo no gene <i>TP53*248</i> .....	19
Figura 7.	Distribuição genotípica do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	20
Figura 8.	Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	21
Figura 9.	Distribuição alélica do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	22
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene <i>P27</i> .....	22
Figura 11.	Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene <i>FAS</i> .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Arg	Arginina
BAX	Proteína que se liga à BCL-2, também conhecido como regulador de apoptose
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> – quinase dependente de ciclina
CYP17	Citocromo P450, família 17
CYP19	Citocromo P450, família 19
DNA	<i>Desoxi-ribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucléico
FAS	Receptor pertencente à superfamília de receptores TNF, também conhecido como ALPS1A, APO-1, APT1, CD95, FAS1, FASTM, TNFRSF6
Fase G1	GAP1, intervalo 1 do ciclo celular
Fase S	Fase de síntese do DNA durante o ciclo celular
FASL	Ligante do gene FAS
GADD45	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible</i> – proteína que pára o ciclo celular em caso de danos no DNA
Gln	Glicina
Glu	Glutamina
GSTM1	Glutathione s-transferase M1
GSTT1	Glutathione s-transferase T1
IC	Intervalo de confiança
IFN	Intérferon

IL	Interleucina
IL-R	Receptor de interleucina
kDa	kilodalton
Lys	Lisina
MDM2	Ligante do gene <i>TP53</i>
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chances
P27	Gene Inibidor de quinase dependentes de ciclina 1B, também conhecido como, CDKN1B, Kip <sup>1</sup>
pb	Par de base nitrogenada
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
Pro	Prolina
PROGINS	<i>Progesterone receptor</i> – receptor de progesterona
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – polimorfismo baseado em tamanho do fragmento
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de único nucleotídeo
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> – Fator de Necrose Tumoral
Trp	Triptofano
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i> – proteína tumoral p53 – também conhecido como, <i>p53 antigen</i> ; <i>p53 transformation suppressor</i> ; <i>p53 tumor suppressor</i> ; <i>phosphoprotein p53</i> ; <i>transformation-related protein 53</i>

## Resumo

**Introdução:** Endometriose é uma afecção ginecológica benigna e, em sua fisiopatologia, encontramos os distúrbios do ciclo celular e apoptose. Os genes *TP53*, *P27* e *FAS*, que participam da regulação do ciclo celular e apoptose, apresentam polimorfismos que podem ter influência funcional. **Objetivo:** Avaliar se há associação entre a presença dos polimorfismos nos genes *TP53* (códon 11, 72, 248), *P27* (V109G) e *FAS* (A670G) com a endometriose. **Método:** Estudo transversal, caso-controle onde foram pesquisados polimorfismos nos genes *TP53* (códon 11, 72 e 248), *P27* e *FAS* por PCR-RFLP em DNA extraídos de swab bucal de mulheres com e sem endometriose. **Resultados:** Os códon 11 e 248 do gene *TP53* apresentaram raros alelos mutados, levando-se a crer que os polimorfismos destes códon não apresentam relevância clínica para a endometriose. O polimorfismo do gene *FAS* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos endometriose e controle. Já no estudo do polimorfismo do gene *TP53* (códon 72) e do gene *P27*, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos endometriose e controle ( $p=0,01$ ; OR= 2,19; IC de 95%= 1,196-4,039 e  $p=0,017$ ; OR= 1,93; IC de 95%= 1,12-3,34; respectivamente). **Conclusões:** Os polimorfismos dos genes *TP53\*72* e *P27* parecem estar associados à endometriose. Os polimorfismos dos genes *TP53\*11*, *TP53\*248* e *FAS* não parecem estar associados à endometriose.

## **1. INTRODUÇÃO**



A endometriose é uma afecção ginecológica benigna, definida pela presença de implantes de endométrio funcional fora do útero, principalmente na pelve, podendo causar lesões inflamatórias (Ulukus et al, 2006; Falconer et al, 2007). Como os implantes endometriais respondem de forma natural ou induzida às variações nos níveis de estrógeno, a endometriose é considerada uma afecção hormônio-dependente (Berkley et al, 2005). Afeta de 5-15% de mulheres, principalmente, na idade reprodutiva e cerca de 40-80% destas sofrem de dor pélvica crônica e/ou infertilidade (Eskenazi e Warner, 1997; Vinatier et al, 2000), além de outros sintomas como dismenorréia e dispareunia (Giudice e Kao, 2004; Nap et al, 2004; Berkley et al, 2005).

A fisiopatogênese da endometriose ainda permanece desconhecida, porém, existem três teorias para explicar seu desenvolvimento:

- Teoria de desenvolvimento por metaplasia – sugere que o epitélio germinativo dos ovários e os ductos müllerianos derivados do epitélio celômico se transformam, por metaplasia, em endométrio (Meyer\*, 1919 e Fujii\*\*, 1991 citado por Vinatier, 2001);
- Teoria de indução – extensão da teoria celômica, propondo que um ou mais fatores imunológicos, endógenos e bioquímicos poderiam induzir a diferenciação endometrial a partir de células indiferenciadas (Vinatier, 2001);
- Teoria da implantação – a mais aceita das teorias – proposta por Sampson, nos anos 1920 (Sampson, 1922; Sampson, 1927), onde a desordem inicia-se a partir da menstruação retrógrada, em que as células do endométrio se destacam e, através da tuba uterina, caem na cavidade peritoneal. A presença da doença na pelve é atribuída à adesão de fragmentos de endométrio no epitélio peritoneal, invasão deste epitélio, estabelecimento de suprimento sanguíneo e indução da resposta imunológica sub-ótima, resultando na sobrevivência do tecido implantado (Halme et al, 1984).

Atualmente, considera-se que fatores genéticos, imunológicos, endócrinos e ambientais possam desempenhar importante papel na patogênese da doença devido às alterações nas características das células endometriais (Vinatier et al. 2001; Ulukus, 2006). Sharpe-Timms (2001) sugere que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose apresenta diferenças fundamentais quando comparadas ao endométrio eutópico de mulheres sem a doença, tanto funcionais como estruturais. Duas dessas diferenças podem explicar a proliferação da endometriose: alterações no ciclo celular (MacLachlan, 1995; Meresman, 2000) e alterações na regulação da apoptose

(Hopwood e Levison, 1976; Otsuki et al. 1994). Contudo, investigações recentes mostram que muitas lesões endometrióticas tem origem monoclonal, indicando sua natureza neoplásica (Falconer, 2007)

O ciclo celular e a apoptose podem ser regulados por uma série de mediadores. Dentre eles, estão as proteínas p53 e p27, que controlam o ciclo celular, e o receptor transmembrânico FAS, que promove apoptose.

O gene *TP53*, codifica a proteína de nome p53 que está relacionada com a regulação do ciclo celular e apoptose. Tem função como “gatekeeper” ou guardião da divisão celular (Levine, 1997) e, portanto, é essencial para a prevenção do desenvolvimento tumoral. As mutações no gene *TP53* estão associadas com instabilidade no desenvolvimento e progressão celular e, a proteína p53, quando não está mutada, ativa outros genes supressores de tumor que são fundamentais para a regulação e progressão do ciclo celular e apoptose em caso de danos no DNA (Loging e Reisman, 1999) e, em resposta ao estresse oncogênico e outros estresses celulares, induz a super-regulação ou a sub-regulação em uma variedade de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, reparo de DNA, senescência ou apoptose (Vogelstein et al, 2000; Vousden e Lu, 2002; Levine et al, 2006). A proteína p53 está inativada por algum tipo de mutação em 50% de todos os cânceres humanos (Joerger e Fersht, 2008). A perda funcional do gene *TP53* pode estar associada com o desenvolvimento tumoral e, a proteína anormal está presente algumas espécimes de tumor, incluindo carcinoma cervical (Zehbe et al, 1999), carcinoma ovariano (Kupryjanczyk et al, 1994), câncer de bexiga (Esrig et al, 1994), câncer de próstata (Steiner et al, 2000) entre outros (Boley et al, 2000; Miyazaki et al, 2000; Nutt et al, 2000).

O polimorfismo mais comum encontrado no gene *TP53* encontra-se no códon 72, onde há a substituição de arginina por prolina tem sido associado a um aumento de risco para o surgimento de alguns tumores (Akkiprik et al, 2008; Boldrini et al, 2008; de Carvalho et al, 2008; Vieira et al, 2008;) bem como em outras doenças – lúpus eritematoso sistêmico (Piotrowski et al, 2008), pterígio associado ao HPV (Rodrigues et al, 2008) e doenças autoimunes da tireóide e tireoidite de Hashimoto (Chen et al, 2008). O polimorfismo do gene *TP53* nos códons 11 e 248 também foram relacionados com tumores de pulmão (Hussain et al, 2001), câncer de ovário (Manahan et al, 2001) e leucemia linfoblástica aguda (Zhou et al, 1998).

Assim como a p53, a proteína p27 desempenha importante papel como supressor tumoral, sendo responsável pelo controle da transição da fase G1 para S, o

chamado *check point*. Schor et al (2008) observaram o decréscimo desta proteína em mulheres com endometriose. Em adição, diversos trabalhos demonstraram correlação significativa entre a diminuição desta proteína e diversas neoplasias (Lloyd et al, 1999; Li et al, 2004; Zheng et al, 2005). Foi descrito um polimorfismo envolvendo a troca de um único nucleotídeo (T→G) no códon 109 que causa a substituição de um aminoácido glicina por valina e esta alteração pode, também estar relacionada a algumas neoplasias, como câncer de mama, cólon e próstata (MacLachlan et al, 1995; Lloyd et al, 1999).

Em relação a apoptose, esta é crucial para o desenvolvimento dos organismos por eliminar células indesejadas e potencialmente perigosas - e anormalidades na sua regulação implicam no desenvolvimento de certas doenças como, sabidamente, o câncer. (Lowe e Lin, 2000; Evan e Vousden, 2001). Gebel et al (1998) observaram que a porcentagem de apoptose nas células endometriais de mulheres com endometriose foi dramaticamente reduzida, implicando em maior número de células sobreviventes na cavidade peritoneal.

O receptor transmembrânico FAS, também conhecido por CD95 ou APO-1, desempenha papel central na sinalização apoptótica em diferentes tipos celulares. Este receptor interage com seu ligante natural que leva o nome de FASL, membro da super-família da TNF (*Tumor Necrosis Factor*), para dar início à cascata de sinais de morte celular (Nagata e Golstein, 1993; Suda et al, 1993). O polimorfismo envolvendo a troca de um único nucleotídeo na posição promotora -670 (A/G) foi recentemente identificado (Huang et al, 1997; Sibley et al, 2003) e associado a diversas afecções como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e algumas neoplasias ginecológicas (Huang et al, 1997, Huang et al, 1999; Kanemitsu et al, 2002; Lai et al, 2003; Engelmark et al, 2004). Ainda com relação a apoptose nosso grupo, recentemente, encontrou uma significativa diminuição desse fenômeno no endométrio de mulheres com endometriose (D'Amora et al, 2009). Dessa forma e dando continuidade à nossa linha de pesquisa interessou-nos avaliar a eventual associação entre os polimorfismos presentes em genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose com a endometriose.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objeto avaliar se há associação entre a presença dos polimorfismos nos genes *TP53* (códon 11, 72, 248), *P27* (V109G) e *FAS* –A670G com a endometriose.

### **3. PACIENTES E MÉTODOS**

Trata-se de estudo transversal com dois grupos: GRUPO ENDOMETRIOSE e GRUPO CONTROLE. O Grupo Endometriose foi composto de pacientes com queixa de dor pélvica, submetidas à laparoscopia com diagnóstico confirmado de endometriose por exame histopatológico.

O grupo controle foi composto por mulheres na pós-menopausa, sem história pregressa sugestiva de endometriose, ou seja, antecedentes de dor pélvica crônica (dismenorréia e/ou dispareunia), infertilidade, bem como nenhuma doença ginecológica hormônio-dependente. O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo e todas as pacientes incluídas no protocolo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

#### *Coleta do DNA genômico*

O DNA genômico das pacientes foi obtido por meio de *swab* bucal com escova do tipo Cytobrush® seguido de bochecho com soro fisiológico 0,9%. No laboratório, os frascos contendo o material coletado foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 min; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi destinado à extração do DNA genômico utilizando-se o kit *GFX™ Genomic DNA Purification kit* (Amersham Biosciences/GE) seguindo as recomendações do fornecedor. O DNA genômico purificado foi mantido à temperatura de -20°C até a amplificação por PCR.

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

As condições de PCR e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos polimorfismos dos genes foram descritos anteriormente e adaptados em nosso laboratório. Resumidamente, as amplificações foram realizadas em volume de 25µL sob condições padrão para PCR (Master Mix, Eppendorf). As condições de ciclagem variam de acordo com o polimorfismo.

#### *Polimorfismo do gene TP53 – códon 11 (TP53\*11)*

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 55°C por 30 seg., polimerização a 72°C por 30 seg. até extensão final a 72°C por 7 min. As seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas para a amplificação da

região que contém o polimorfismo *TP53\*11*: 5' CTT GGG TTG TGG TGA AAC ATT 3' (*primer 5'*) e 3' GTC AGT CCC ATG AAT TTT CGC T 3' (*primer 3'*). A amplificação da região do gene gera um produto de PCR de 379pb que, quando incubado com a enzima *TaqI* (NEb, New England Byolabs) por 45 minutos a 65°C, pode ser clivado em dois fragmentos de 239 e 140 pb quando está presente o alelo Glu, sem variação. Já, na presença do alelo variante Gln/Lys, o produto (379 pb) não é clivado. Deste modo, os genótipos possíveis são: Glu – Glu, Glu – Gln/Lys e Gln/Lys – Gln/Lys.

#### *Polimorfismo do gene TP53 – códon 72 (TP53\*72)*

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 58°C por 30 seg., polimerização a 72°C por 45 seg. até extensão final a 72°C por 7 min. As seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas para a amplificação da região que contém o polimorfismo *TP53\*72*: 5' TCC CCC TTG CCG TCC CAA 3' (*primer 5'*) e 5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT 3' (*primer 3'*). A amplificação da região do gene gera um produto de PCR de 279 pb que, quando incubado com a enzima *BstUI* (NEb, New England Byolabs) por 4 horas a 37°C gera dois fragmentos de 160 e 119 pb quando está presente o alelo variante Pro, sendo que na presença do alelo sem variação Arg, o produto (279 pb) não é clivado. Deste modo, os genótipos possíveis são Arg – Arg, Arg – Pro e Pro – Pro.

#### *Polimorfismo do gene TP53 – códon 248 (TP53\*248)*

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 58°C por 30 seg., polimerização a 72°C por 45 seg. até extensão final a 72°C por 7 min. As seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas para a amplificação da região que contém o polimorfismo *TP53\*248*: 5' TAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC A 3' (*primer 5'*) e 5' TGT GAT GAG AGG TGG ATG GGT A 3' (*primer 3'*). A amplificação da região do gene gera um produto de PCR de 233pb que, quando incubado com a enzima *HpaII* (NEb, New England Byolabs) gera fragmentos de 167 e 69 pb quando está presente o alelo Arg, sem variação. Na presença do alelo variante Trp/Gln, o produto não é clivado (233pb). Os genótipos possíveis, deste modo, são: Arg – Arg, Arg – Trp/Gln e Trp/Gln – Trp/Gln.



#### *Polimorfismo do gene P27 – V109G*

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 min e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 56,7°C por 1 min, polimerização a 72°C por 1 min até extensão final a 72°C por 7 min. As seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas para a amplificação da região que contém o polimorfismo V109G: 5' TCG AGA CCC GGG AGA AAG 3' (*primer 5'*) e 5' CCG CTA ACC CCG TCT GG 3' (*primer 3'*). A amplificação da região do gene *P27* gera um produto de PCR de 454pb que, quando incubado com a enzima *BglI* (Promega) por 3 horas a 37°C, pode ser clivado em dois ou três fragmentos, a depender do códon encontrado. Na presença do códon correspondente à valina (V), alelo sem variância, o produto de PCR é clivado em dois fragmentos, de 378 e 76 pb. Já na presença do alelo variante, correspondente à glicina (G), forma-se três fragmentos, de 262, 116 e 76 pb. Assim, temos como genótipos possíveis: VV, VG e GG.

#### *Polimorfismo do gene FAS – A670G*

As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 3 min e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min, polimerização a 72°C por 1 min até extensão final a 72°C por 7 min. As seguintes seqüências de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas para a amplificação da região do gene *FAS* que contém o polimorfismo A670G: 5' CTA CCT AAG AGC TAT CTA CCG TTC 3' (*primer 5'*) e 5' GGC TGT CCA TGT TGT GGC TGC 3' (*primer 3'*). A amplificação da região do gene *FAS* gera um produto de PCR de 331pb que, quando incubado com a enzima *MvaI* (Promega) por 3 horas a 37°C, pode ser clivado e m dois fragmentos de 233 e 98 pb para o alelo adenosina (A), sem variância e 189, 98 e 44 pb para o alelo variante guanossina (G). Portanto, os genótipos possíveis são: AA, AG e GG.

Todos os produtos de PCR e RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% adicionado de 1,5µL de brometo de etídeo.

### *Análise Estatística*

As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – *Statistical Package for Social Sciences* (v14.0). Para comparação de variáveis qualitativas entre os grupos Endometriose e Controle, ou seja, frequências e proporções genotípicas e alélicas, foi utilizado o Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando possível. O valor de significância estatística foi estabelecido em 5%, ou  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

*Polimorfismo do gene TP53 (códon 11, 72 e 248)*

*a) Polimorfismo TP53\*11*

Foram incluídas 241 mulheres, sendo 125 no grupo Endometriose e 116 no grupo Controle.

A grande maioria das pacientes incluídas apresentou o genótipo sem variação (Glu – Glu). O genótipo heterozigoto (Glu – Gln/Lys) foi encontrado somente em 4% do grupo Endometriose, enquanto que o genótipo homozigoto mutado (Gln/Lys – Gln/Lys) foi encontrado somente no grupo controle (1,72%). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto entre o genótipo homozigoto sem variação e homozigoto com variação, conforme visualizado na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição genotípica do polimorfismo do gene p53 - códon 11

Genótipo	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Glu - Glu	120	96	114	98,28	234	97,10
Glu - Gln/Lys	5	4	0	0	5	2,07
Gln/Lys - Gln/Lys	0	0	2	1,72	2	0,83
Total	125	100	116	100	241	100

Teste Exato de Fisher:

Glu-Glu X Glu-Gln/Lys X Gln/Lys-Gln/Lys	p= 0,02 *
Glu-Glu X Glu-Gln/Lys	p= 0,03 *
Glu-Gln/Lys X Gln/Lys-Gln/Lys	p= 0,04 *
Glu-Glu X Gln/Lys-Gln/Lys	p= 0,24 NS

Devido à pequena proporção de genótipos com alelo variante, optamos por agrupá-los em um grupo único, denominado genótipo Não Glu – Glu. Com esse arranjo, tentando verificar a influência do alelo variante (Gln/Lys), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene p53 - códon 11

Genótipo	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Glu - Glu	120	96	114	98,28	234	97,10
Não Glu - Glu	5	4	2	1,72	7	2,90
Total	125	100	116	100	241	100

Teste Exato de Fisher:

Glu-Glu x Não Glu-Glu:	p=0,255 NS
------------------------	------------

Agrupando os genótipos Glu – Glu com Glu – Gln/Lys X Gln/Lys – Gln/Lys, i.é., comparando as mulheres com ao menos um alelo sem variação contra o genótipo homocigoto variante (Gln/Lys – Gln/Lys), também não encontramos significância estatística ( $p= 0,23$ ).

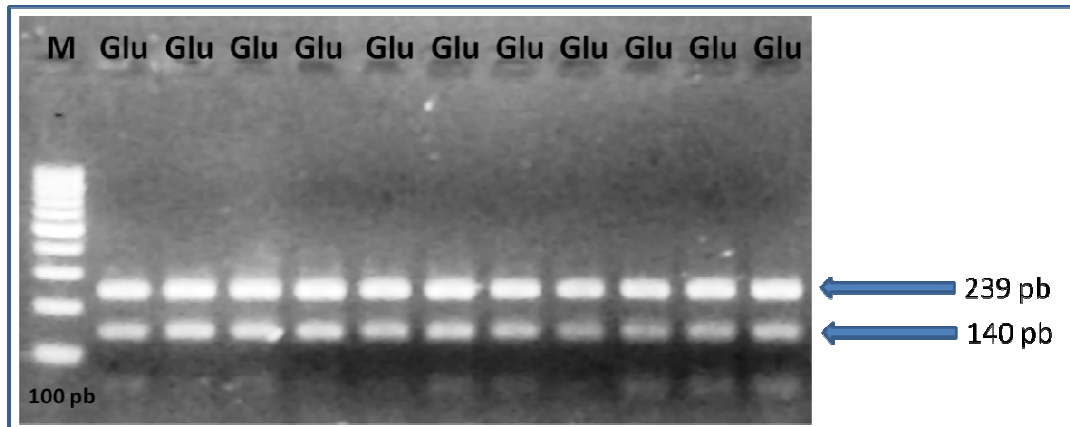
Considerando-se a distribuição alélica, houve grande predomínio do alelo sem variação Glu, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição alélica do polimorfismo do gene p53 - códon 11

Alelo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Glu	245	98	228	98,28	473	98,13
Gln/Lys	5	2	4	1,72	9	1,87
Total	250	100	232	100	482	100

Teste Exato de Fisher Glu X Gln/Lys  $p=0,54$  NS

Na Figura 1, pode-se observar o gel de eletroforese em agarose do estudo do polimorfismo do gene *TP53*\*11.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene *p53*\*11. Na presença do alelo sem variação Glu, o produto de PCR de 379pb é clivado em dois fragmentos de 239 e 140pb. Nesta foto, apenas observamos genótipo Glu-Glu. M=marcador. Na presença do alelo variante Gln/Lys, o fragmento de 379bp não é clivado.

#### b) Polimorfismo *TP53*\*72

Foram incluídas 251 mulheres, sendo 130 no grupo Endometriose e 121 no grupo Controle.

A distribuição genotípica do polimorfismo do *TP53\*72* pode ser visualizada na Tabela 4 e Figura 2. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando todas as combinações entre os genótipos, exceto quando comparados os genótipos Arg – Pro e Pro – Pro.

Tabela 4: Distribuição genotípica do polimorfismo do gene p53 - códon 72

Genótipo	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg - Arg	21	16,15	36	29,75	57	22,71
Arg - Pro	67	51,54	57	47,11	124	49,40
Pro - Pro	42	32,31	28	23,14	70	27,89
Total	130	100	121	100	251	100

Teste qui-quadrado:

Arg-Arg X Arg-Pro X Pro-Pro

p=0,02 \*

Arg-Arg X Arg-Pro

p=0,02 \*

Arg-Pro X Pro-Pro

p=0,14 NS

Arg-Arg X Pro-Pro

p= 0,008 \*

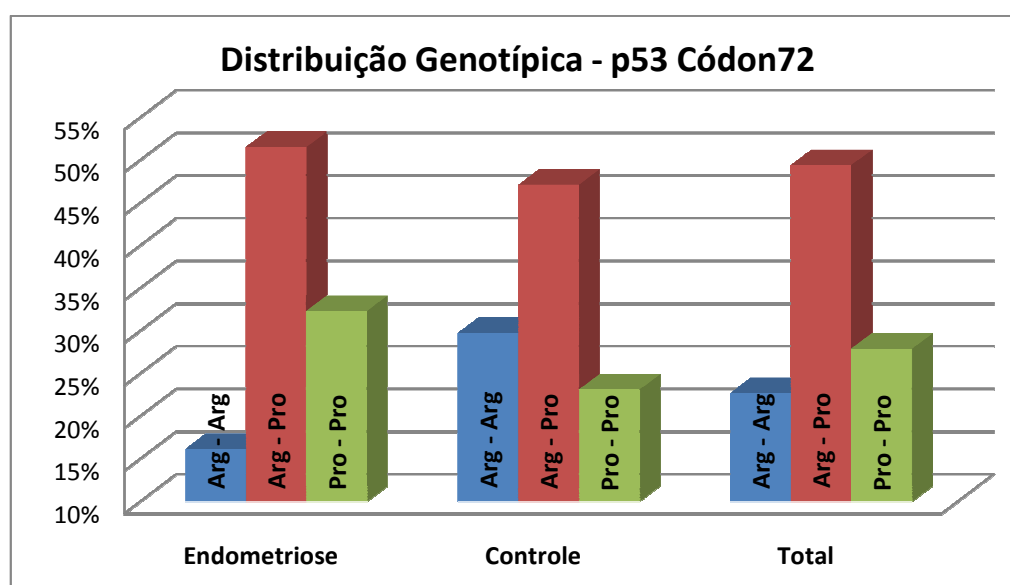


Figura 2. Distribuição genotípica do polimorfismo p53\*72.

Para avaliar a importância da presença do alelo variante Pro na endometriose, optamos por agrupar os genótipos Arg – Pro e Pro – Pro num grupo único, denominado Não Arg – Arg. Assim, pudemos comparar o genótipo Arg – Arg com os genótipos que apresentaram o alelo variante Pro. Na Tabela 5 e Figura 3, podemos observar que há diferença estatística entre os grupos. A presença de ao menos um alelo variante leva a uma chance 2,19 vezes maior de apresentar endometriose.

Tabela 5: Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene p53 - códon 72

Genótipo	Endometriose		Grupos Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg - Arg	21	16,15	36	29,75	57	22,71
Não Arg - Arg	109	83,85	85	70,25	194	77,29
Total	130	100	121	100	251	100

Teste qui-quadrado: Arg-Arg X Não Arg-Arg p=0,01 \*  
Odds Ratio = 2,198 IC 95% = 1,196 a 4,039

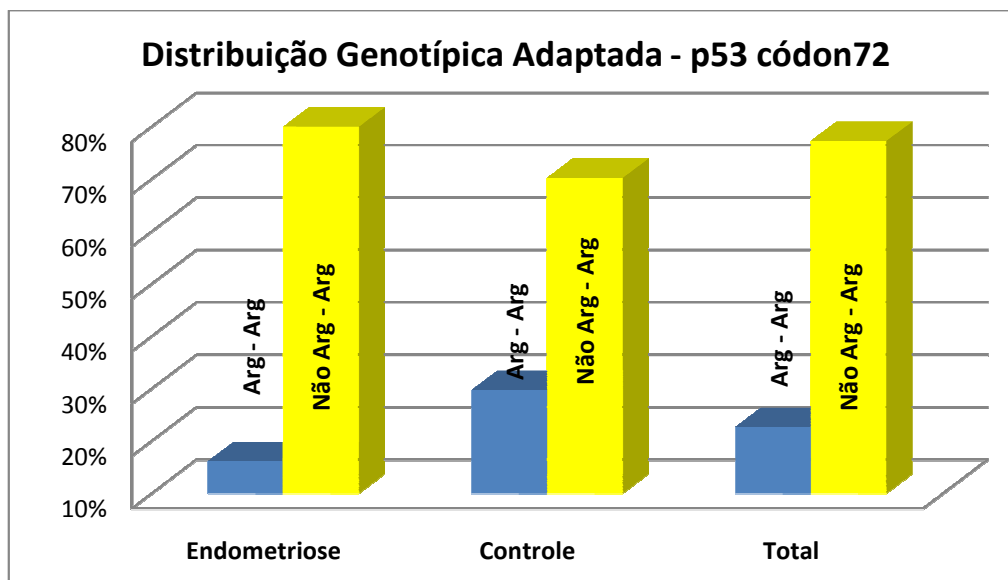


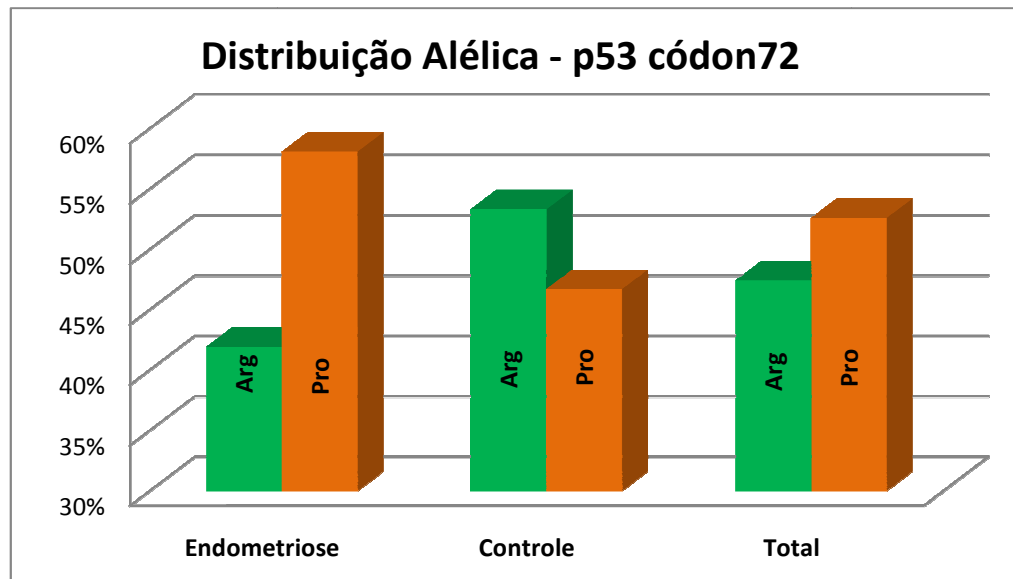
Figura 3. Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo p53\*72

Considerando-se apenas os alelos isoladamente, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme demonstramos na Tabela 6. Interessante observar na Figura 4 que há inversão da proporção entre Arg e Pro entre os grupos Endometriose e Controle.

Tabela 6: Distribuição alélica do polimorfismo do gene p53 - códon 72

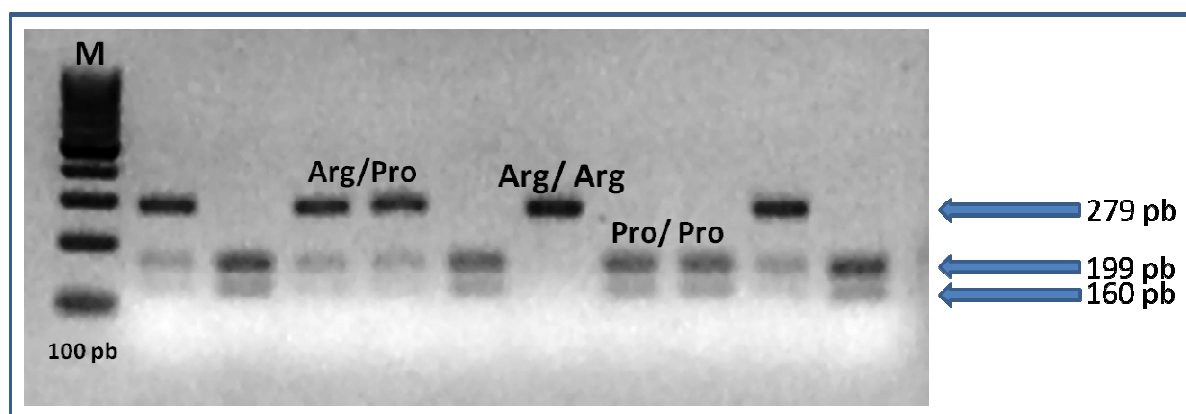
Alelo	Endometriose		Grupos Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg	109	41,92	129	53,31	238	47,41
Pro	151	58,08	113	46,69	264	52,59
Total	260	100	242	100	502	100

Teste Qui-quadrado Arg X Pro p=0,01 \*  
Odds Ratio = 1,58 IC 95% = 1,11 a 2,25



**Figura 4.** Gráfico de distribuição alélica do polimorfismo p53\*72

Podemos visualizar a eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo do gene *TP53\*72* na Figura 5.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene p53\*72. O produto de PCR de 279bp é clivado em dois fragmentos de 199 e 160pb somente na presença do alelo variante Pro. Na presença do alelo sem variação Arg, não ocorre clivagem. M= marcador.

#### c) Polimorfismo *TP53\*248*

Foram incluídas 253 mulheres, sendo 129 no grupo Endometriose e 124 no grupo Controle.

Apenas uma paciente do grupo Endometriose apresentou genótipo heterozigoto Arg – Trp/Gln. Todos os outros participantes apresentaram genótipo sem variação Arg – Arg. Não houve presença do genótipo homozigoto com variação Trp/Gln – Trp/Gln. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos



Endometriose e Controle, conforme demonstrado na Tabela 7. Mesmo comparando os genótipos Arg – Arg X Não Arg – Arg (Arg – Trp/Gln e Trp/Gln – Trp/Gln) e apenas os alelos Arg X Trp/Gln, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 8 e 9).

Tabela 7: Distribuição genotípica do polimorfismo do gene p53 - códon 248

Genótipo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg - Arg	128	99,22	124	100	252	99,60
Arg - Trp/Gln	1	0,78	0	0	1	0,40
Trp/Gln - Trp/Gln	0	0	0	0	0	0
Total	129	100	124	100	253	100

Teste exato de Fisher:

Arg-Arg X Arg-Trp/Gln X Trp/Gln-Trp/Gln p= 0,99 NS

Arg-Arg X Arg-Trp/Gln p= 0,50 NS

Arg-Trp/Gln X Trp/Gln-Trp/Gln p= 1 NS

Arg-Arg X Trp/Gln-Trp/Gln p= 1 NS

Tabela 8: Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene p53 - códon 248

Genótipo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg - Arg	128	99,22	124	100	252	99,60
Não Arg - Arg	1	0,78	0	0	1	0,40
Total	129	100	124	100	253	100

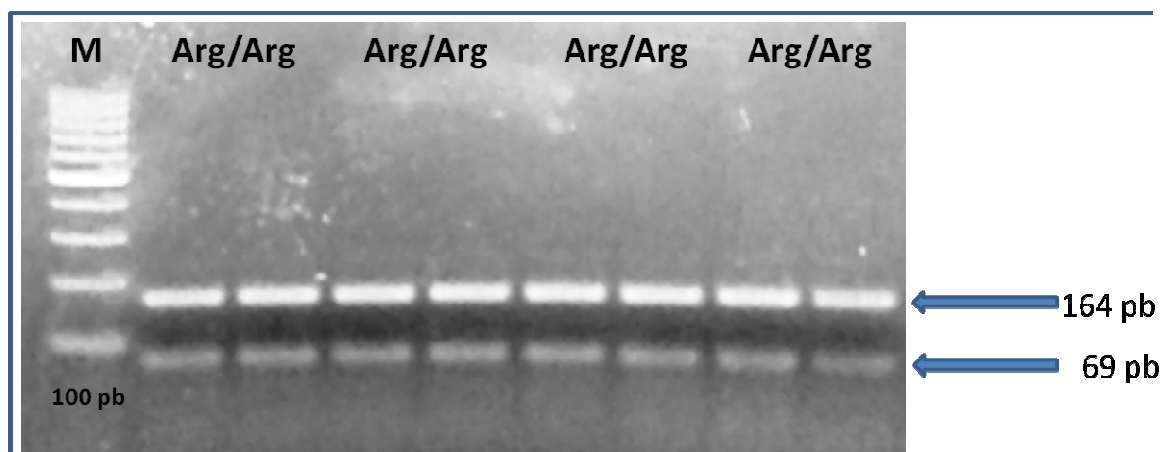
Teste exato de Fisher: Arg-Arg X Não Arg-Arg p=0,51 NS

Tabela 9: Distribuição alélica do polimorfismo do gene p53 - códon 248

Alelo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Arg	257	99,61	248	100	505	99,80
Trp - Gln	1	0,39	0	0	1	0,20
Total	258	100	248	100	506	100

Teste Exato de Fisher Arg X Trp-Gln p=0,51 NS

Na figura 6, podemos visualizar a eletroforese em gel de agarose a 3% do polimorfismo do gene *TP53*\*248.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo p53\*248. O produto de PCR de 233pb gera fragmentos de 167 e 69pb na presença do alelo sem variação Arg. Quando ocorre o alelo variante Trp/Gln, o produto de 233pb não é clivado. M= marcador.

### *Polimorfismo do gene P27*

No estudo do polimorfismo do gene *P27* foram incluídas 213 pacientes, sendo 104 no grupo Endometriose e 109 no grupo Controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre todas as comparações, exceto entre os genótipos VV e VG, conforme demonstrado na Tabela 10. Podemos visualizar a distribuição genotípica na Figura 7.

Tabela 10: Distribuição genotípica do polimorfismo do gene p27

Genótipo	Endometriose		Grupos Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
VV	48	46,15	68	62,39	116	54,46
VG	40	38,46	35	32,11	75	35,21
GG	16	15,39	6	5,5	22	10,33
<b>Total</b>	<b>104</b>	<b>100</b>	<b>109</b>	<b>100</b>	<b>213</b>	<b>100</b>

Teste qui-quadrado:

VV x VG x GG p=0,016 \*  
 VV x VG p=0,07 NS  
 VG x GG p=0,017 \*  
 VV x GG p=0,005 \*

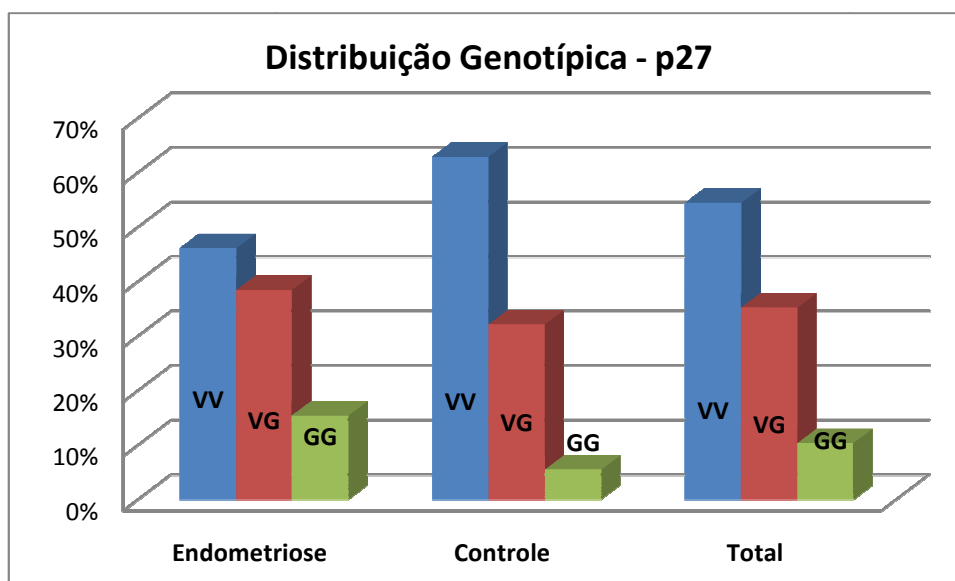


Figura 7. Distribuição genotípica do polimorfismo do gene *P27*.

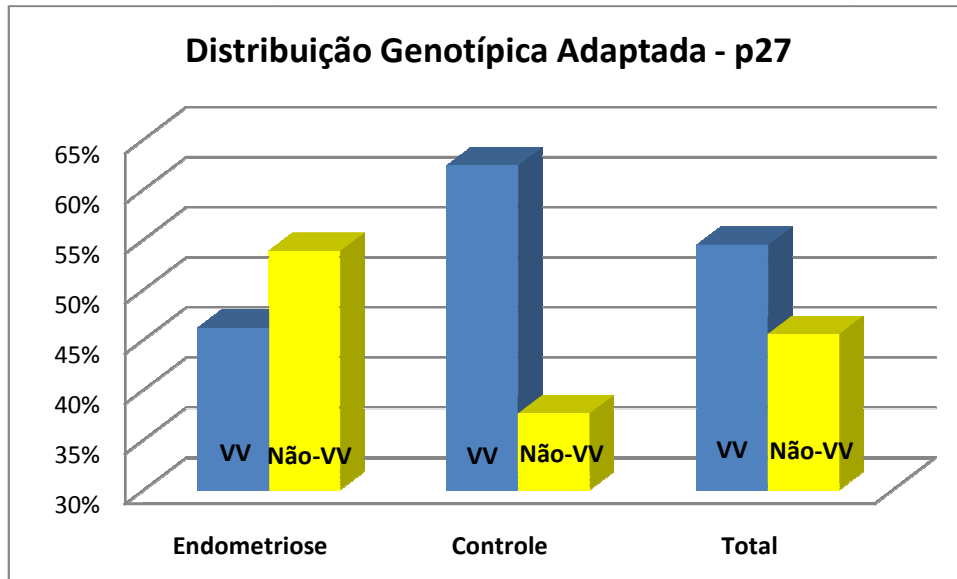
Para verificar a influência do alelo com variação (G) nos genótipos, na Endometriose, optamos por agrupar os genótipos VG e GG como genótipo Não-VV. Com isso, observamos que a presença de ao menos um alelo mutado pode aumentar a chance de desenvolver a doença em 1,93 vezes, conforme demonstrado na Tabela 11. Podemos visualizar na Figura 8 que há inversão na proporção entre genótipos VV X Não – VV entre pacientes com endometriose e controles.

Tabela 11: Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo do gene *p27*

Genótipo	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
VV	48	46,15	68	62,39	116	54,46
Não-VV	56	53,85	41	37,61	97	45,54
Total	104	100	109	100	213	100

Teste qui-quadrado:  
Odds Ratio=1,93

VV x Não-VV      p=0,017 \*  
IC 95% = 1,12 a 3,34



**Figura 8.** Distribuição genotípica adaptada do polimorfismo *P27*.

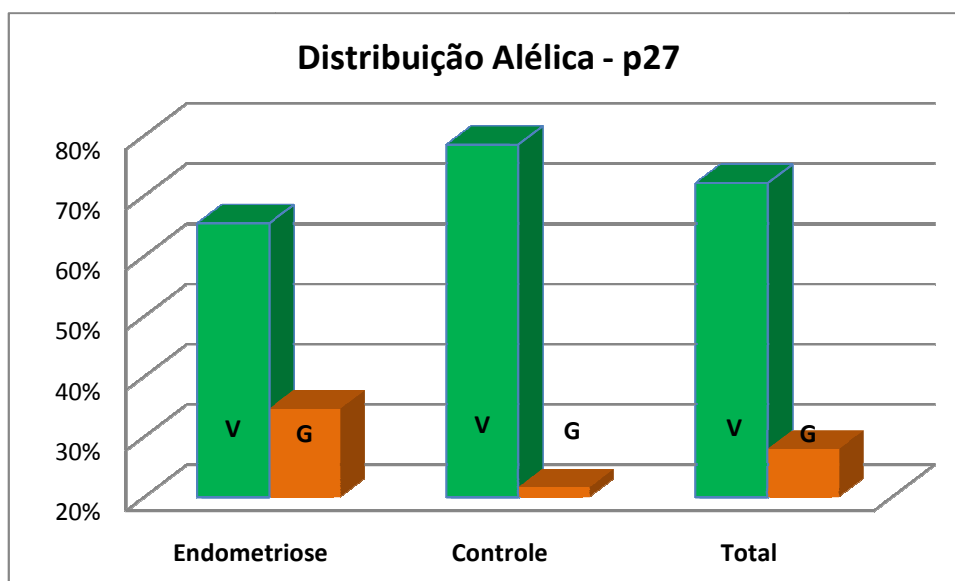
Houve diferença estatisticamente significativa também quando comparadas as freqüências alélicas, conforme demonstrado na Tabela 12. A presença do alelo com variação (G) induz a chance 1,92 vezes maior de apresentar a doença. Podemos visualizar na Figura 9 que o alelo com variação está proporcionalmente mais freqüente nas pacientes com endometriose.

Tabela 12: Distribuição alélica do polimorfismo do gene p27

Alelo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
V	136	65,38	171	78,44	307	72,07
G	72	34,62	47	21,56	119	27,93
Total	208	100	218	100	426	100

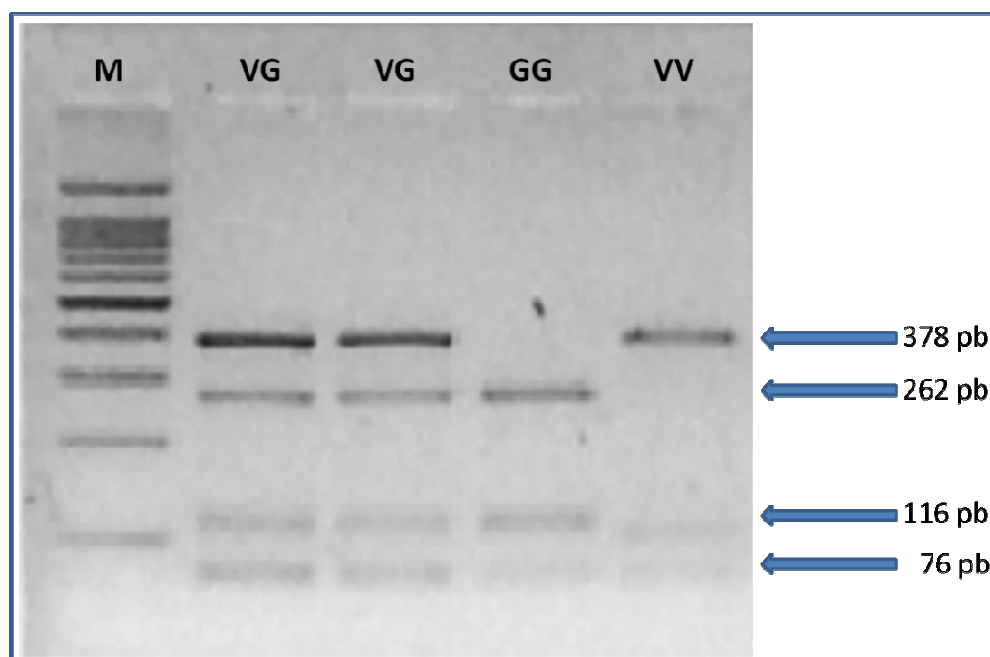
Teste qui-quadrado  
Odds ratio = 1,92

V x G                      p=0,002 \*  
IC 95% = 1,25 A 2,96



**Figura 9.** Distribuição alélica do polimorfismo do gene *P27*.

Na Figura 10, apresentamos a eletroforese em gel de agarose 3% para o estudo do polimorfismo do gene *P27*.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene *P27*. O produto de PCR de 454pb é clivado em dois fragmentos de 378 e 76 pb na presença do alelo sem variação V. Quando encontramos o alelo variante G, o produto é clivado em três fragmentos (262, 116 e 76pb). M= marcador.

### Polimorfismo do gene *FAS*

No estudo do polimorfismo do gene *FAS* foram incluídas 154 pacientes, sendo 68 no grupo Endometriose e 86 no grupo Controle.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para o polimorfismo do gene *FAS*, conforme visualizado na Tabela 13.

Tabela 13: Distribuição genotípica do polimorfismo do gene *FAS*

Genótipo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
AA	19	27,94	28	32,56	47	30,52
AG	29	42,65	29	33,72	58	37,66
GG	20	29,41	29	33,72	49	31,82
Total	68	100	86	100	154	100

Teste qui-quadrado:

AA x AG x GG p=0,52 NS

AA x AG p=0,30 NS

AG x GG p=0,31 NS

AA x GG p=0,48 NS

Mesmo agrupando os genótipos para verificar a influência do alelo A ou do alelo G na doença, não encontramos significância estatística. Quando comparamos o genótipo AA x Não-AA (AG e GG),  $p=0,53$ . Já, quando comparamos o genótipo GG X Não-GG (AA e AG),  $p=0,56$ .

Considerando-se isoladamente os alelos A e G, também não identificamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos Endometriose e Controle (Tabela 14).

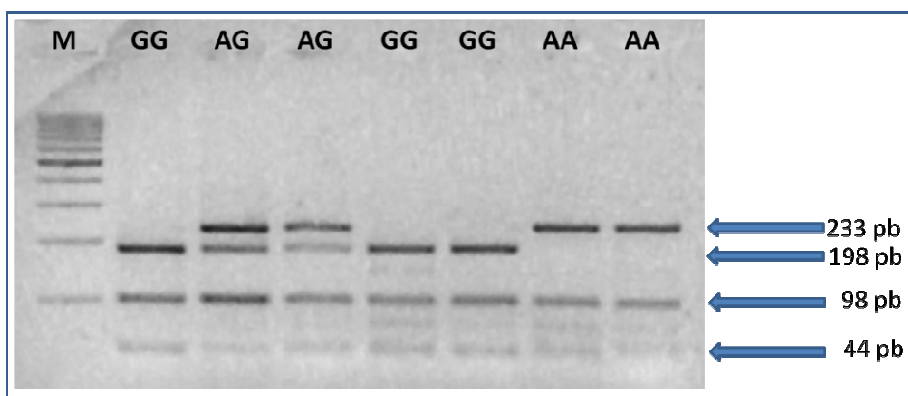
Tabela 14: Distribuição alélica do polimorfismo do gene *FAS*

Alelo	Grupos					
	Endometriose		Controle		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
A	67	49,26	85	49,42	152	49,35
G	69	50,74	87	50,58	156	50,65
Total	136	100	172	100	308	100

Teste qui-quadrado

A x G  $p=0,97$  NS

Na Figura 11, demonstramos a eletroforese em gel de agarose 3% do estudo do polimorfismo do gene *FAS*.



**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose do polimorfismo do gene *FAS*. O produto de PCR de 331pb é clivado em dois fragmentos de 233 e 98pb na presença do alelo A, sem variância. Já na presença do alelo variante G, o produto é clivado em três fragmentos de 189, 98 e 44pb. M= marcador.

## **5. DISCUSSÃO**



Nos últimos 10 anos, o número de estudos envolvendo a questão de polimorfismos genéticos mostra que estes podem ser um fator contribuinte para o desenvolvimento da endometriose (Tempfer et al, 2004). Mais de 20 genes candidatos foram estudados e foram positivamente associados à endometriose, sendo utilizadas várias técnicas de detecção destes polimorfismos (Falconer, 2007). Dentre os genes estudados, estão os que codificam interferon gama (IFN)- $\gamma$  (Kitawaki et al, 2004), as interleucinas (IL) e seus receptores (IL-R) (Hsieh et al, 2005; D'Amora et al, 2006; Juo et al, 2008), fator de necrose tumoral  $\alpha$  e  $\beta$  (TNF) (Teramoto et al, 2004; Lee et al, 2008) e seus receptores - as glutatona s-transferase M1, T1 e P1 (GSTM1, GSTT1 e GSTP1) (Hsieh et al, 2004; Guo, 2005; Hur et al, 2005), citocromo P450c17 e P450c19 (CYP17 e CYP19) e PROGINS (de Carvalho et al, 2007; Vietri et al, 2008). Estudos envolvendo o polimorfismo nos genes *FAS* e *FASL* (Fernández et al, 2005), *P21* (Hsieh et al, 2001) e *TP53* (Lattuada et al, 2004; Hsieh et al, 2006; Vietri et al, 2007; Ammendola et al, 2008) também foram realizados ao longo do tempo, tendo como base a sugestão de que o mecanismo fisiopatológico da endometriose poderia ser implicado, como no nosso estudo, na desregulação do processo apoptótico normal no endométrio. Uma das principais vias apoptóticas e que desempenha um papel fundamental na morte celular programada das células do endométrio é o sistema FAS – FASL e este também poderia estar envolvido na fisiopatogênese da endometriose.

Além disso, sabe-se que genes reguladores do ciclo celular e genes supressores de tumor como *P21* e a família *ras* podem estar envolvidos na patogênese da endometriose (Falconer et al, 2007). Nesse sentido, outro gene supressor de tumor e também regulador do ciclo celular, o *P27*, teve expressão subregulada em endométrio eutópico de mulheres com endometriose de acordo com outro estudo realizado pelo nosso grupo (Schor et al, 2009). Todavia, a presença de polimorfismos presentes nesse gene ainda não havia sido estudada por nós até o momento.

O gene *TP53*, um dos principais genes supressores de tumor, é capaz de responder a diversos sinais de estresse (Vogelstein, et al, 2000). A ativação desse gene pode induzir interrupção do ciclo celular, senescência e apoptose contribuindo para a inibição do crescimento tumoral ou ainda, reparando dano genômico e eliminando células potencialmente oncogênicas evitando assim a proliferação destas (Nakayama et al, 2001).

A proteína sem mutação funciona como fator de transcrição que ativa outros genes supressores de tumor como, por exemplo, *P21*, *MDM2*, *GADD45* e *Bax*, que são

necessários na regulação e progressão do ciclo celular ou apoptose em resposta aos danos no DNA (Loging et al., 1999). A perda funcional da proteína p53 pode estar associada ao desenvolvimento tumoral de aproximadamente 50% dos tumores sólidos humanos incluindo vários tumores da esfera ginecológica (Zehbe et al., 1999; Kupryjanczyk et al, 1994).

O gene *TP53* localiza-se no cromossomo 17 e a aneuploidia desta região pode prejudicar a função do gene que, por sua vez, pode influenciar na progressão da endometriose. De fato, Kosugi et al (1999), observaram aumento de heterogeneidade e aneuploidia do cromossomo 17 em espécimes de endometriose.

Hsieh e Lin (2006) avaliaram o polimorfismo do gene p53 (códon 11, 72 e 248) na população de Taiwan e observaram que o polimorfismo no códon 11 do gene p53, 100% de alelos eram “selvagens”, ou seja, nenhum alelo mutado entre os grupos caso e controle.

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados em nosso estudo onde a presença do alelo “selvagem”, ou seja, alelo Glu11 aparece em 96% dos casos com endometriose e em 98,28% dos controles, sem endometriose. Dada a raridade desta mutação, apesar de diferença estatisticamente significativa, acreditamos que esta variação genética talvez não desempenhe papel relevante na patogênese da endometriose.

Omori et al (2004) não observaram associação do polimorfismo p53\*72 em seu estudo envolvendo indivíduos da população japonesa. Lattuada et al (2004) realizaram o estudo do polimorfismo no códon 72 do gene p53 e não observaram associação deste com endometriose na população italiana. Mais tarde, Ammendola et al (2008) também realizaram estudo semelhante com mulheres pertencentes à população italiana e, da mesma forma, não observaram associação com endometriose.

No entanto, em relação ao estudo polimorfismo no códon 72 do gene p53 em nosso trabalho, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto quando comparado os genótipos Arg-Pro e Pro-Pro. Ao agruparmos estes genótipos e compararmos com o genótipo Arg-Arg, ou seja, comparando o genótipo homocigoto selvagem aos genótipos que apresentam ao menos uma mutação (Não Arg-Arg, ou seja, Arg/Pro e Pro/Pro), identificamos maior frequência de genótipos com mutação no grupo Endometriose, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Ao analisar a literatura pertinente observamos que os nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Hsieh e Lin (2006).

De fato, nosso estudo sugere que a presença de pelo menos um alelo mutado pode aumentar em mais de duas vezes as chances de estas mulheres desenvolverem endometriose.

A associação do polimorfismo no códon 248 de p53 foi reportado em diversos estudos realizados com tumores sólidos (Lin et al, 2001; Hussain et al, 2001; Wang et al, 1994) entretanto, em nosso estudo, não notamos diferença estatisticamente significativa.

Mais uma vez, nossos resultados estão de acordo com aqueles de Hsieh e Lin (2006) onde 100% dos alelos eram “selvagens”, levando-nos a crer que o alelo mutado, além de ser raro na população, parece não ter relevância com o desenvolvimento da endometriose.

Neste estudo também foi investigado a associação do polimorfismo V109G do gene inibidor de CDK p27 na etiologia da endometriose. O papel da proteína p27 no controle do ciclo celular está bem definido e a relação de sua baixa expressão em várias neoplasias já se encontra bem documentada (Zheng et al, 2005).

Estudo prévio do nosso grupo observou a baixa expressão da proteína p27 no endométrio eutópico de pacientes com endometriose e sugeriram a associação desta com descontrole do ciclo celular previamente observada nestas pacientes (Schor et al, 2008).

Dessa forma, dando continuidade às nossas linhas de pesquisa, optamos por tentar encontrar uma eventual correlação entre polimorfismos presentes nesse gene com o desenvolvimento da endometriose.

Nossos resultados sugerem assim que mulheres com pelo menos um alelo mutado (G) no códon 109 do gene p27 podem ter duas vezes mais chance de desenvolver endometriose quando comparadas com mulheres com genótipo VV.

Até hoje, não existe nenhum estudo publicado que informe de forma direta a relevância do potencial funcional deste polimorfismo, que pode provocar modificação estrutural da proteína p27 e alterar sua interação com outras proteínas como, por exemplo, a p38 – codificada pelo gene Jab1 que interage diretamente com a p27 (Claret et al, 1996).

A superexpressão da p38 em células de mamíferos resulta na translocação da p27 do núcleo para o citoplasma, causando decréscimo da p27 na célula devido a sua degradação pela via ubiquitina-proteassomo (Pagano et al, 1995). Dessa forma,

quando a p38 se liga de forma específica à p27, torna-se um regulador negativo da mesma.

O polimorfismo V109G do gene p27, que resulta a substituição da valina por glicina, modifica o domínio de ligação interno da p38<sup>jab1</sup> promovendo a translocação citoplasmática e a fosforilação da p27 para sua subsequente degradação dentro do citoplasma (Tomoda et al, 1999). Portanto, é possível que o alelo G possa modificar a afinidade do p27 pela p38 – por promover a degradação da p27, resultando no decréscimo da expressão da proteína (Tomoda et al, 1999).

O gene p27 está localizado no cromossomo 12p13 e codifica uma proteína de 27-kDa (Polyak et al, 1994a; Polyak et al, 1994b) inibidora de CDK a qual inclui o gene p21 (Xiong et al, 1993) e p57 (Matsuoka et al, 1995) considerados como supressores tumorais (Clurman et al., 1998).

A p27, p21 e p57 compartilham sequências comuns que mediam interações entre inibidores de CDK e complexos ciclinas-CDK (Koufos et al, 1989; Hirai et al, 1995; Gollin et al, 2001). O nível de expressão da p27 está positivamente associado com a diferenciação celular (Choi et al, 2003) e especula-se que a p27 esteja envolvida nas vias de regulação de sinais extrínsecos tanto mitogênicos quanto antiproliferativos (Koufos et al, 1989) sendo que a perda de sua função pode contribuir no processo de carcinogênese.

A expressão da p27 está frequentemente reduzida em cânceres, incluindo tumores gástricos, de mama, próstata e pulmão (Kuropkat et al, 1999). Os mecanismos que condicionam essa baixa expressão ainda não são muito conhecidos uma vez que a p27 se apresenta raramente mutada em tumores humanos (Kawamata et al, 1995).

Estudos anteriores indicam que a redução da expressão da p27 está correlacionada com maior potencial invasivo (Kudo et al, 2000), pior prognóstico (Catzavelos et al, 1997; Esposito et al, 1997; Mineta et al, 1999; Ohashi et al, 1999; Kudo et al, 2000), grau de diferenciação (Fredersdorf et al, 1997; Kudo et al, 1998; Catzavelos et al, 1999) e progressão tumoral (Catzavelos et al, 1997) em neoplasias malignas humanas incluindo aquelas consideradas estrogênio-dependentes como câncer de mama e endométrio (Masciullo et al, 2003). Todavia, até o presente momento, nenhum estudo sobre variantes genéticas da p27 haviam sido realizados com a endometriose, outra condição proliferativa e estrogênio-dependente, sendo nosso trabalho pioneiro neste sentido.

Um importante ponto a ser esclarecido refere-se à inclusão de mulheres com idade média de ( $\pm$ SD)  $58,5 \pm 7,8$  no grupo controle. Optou-se por esse tipo de controle pelo fato de, somente dessa forma, ser possível excluir completamente a possibilidade de surgimento de endometriose nas mulheres do grupo controle.

Em relação a apoptose, Dmowski et al (2001) demonstraram que o índice de epitélio glandular de mulheres com endometriose foi significativamente mais baixo que o de mulheres do grupo controle. Esta diferença se dá, primariamente, pelo significativo decréscimo de apoptose durante a fase secretória/ menstrual e fase proliferativa nas mulheres com endometriose. Estes achados nos encorajaram a avaliar o polimorfismo A670G no gene FAS em mulheres com endometriose, pois este gene desempenha papel central na via apoptótica em muitos tipos celulares. Quando há interação do FAS, um receptor transmembrânico, com seu ligante natural, FASL ocorre o início à cascata de sinais apoptóticos resultando na morte celular. A sub-regulação do FAS resulta na resistência aos sinais apoptóticos e já foi observado em alguns tumores, incluindo cânceres ginecológicos (Nagata e Golstein, 1995; Lowe e Lin, 2000; Ueda et al, 2006).

Apesar da grande importância que este gene representa para a apoptose, não encontramos diferença estatisticamente relevante entre os grupos ao estudarmos o polimorfismo do gene FAS, resultado este de acordo com aqueles observados por Fernández et al (2005).

## **6. CONCLUSÃO**

1. O polimorfismo do códon 11 do gene p53 parece não estar associado ao desenvolvimento da endometriose.
2. O polimorfismo do códon 72 do gene p53 parece estar associado ao desenvolvimento da endometriose. A presença de ao menos um alelo mutado (Pro) aumenta em 2,198 vezes a chance de apresentar a doença.
3. O polimorfismo do códon 248 do gene p53 parece não estar associado ao desenvolvimento da endometriose.
4. O polimorfismo V109G do gene p27 parece estar associado ao desenvolvimento da endometriose. A presença de ao menos um alelo mutado (G) aumenta em 1,93 vezes a chance de apresentar a doença.
5. O polimorfismo A670G do gene FAS parece não estar associado ao desenvolvimento da endometriose.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM, Caglar HB, Kaya H, Demirkalem P, et al.. Analysis of p53 Gene Polymorphisms and Protein Over-expression in Patients with Breast Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2008 Dec 2.

Ammendola M, Gloria-Bottini F, Sesti F, Piccione E, Bottini E. Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis. *Fertil Steril.* 2008 aug;90(2):406-8.

Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science.* 2005 Jun 10;308(5728):1587-9. Review.

Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Greco G, Mussi A, et al.. Prognostic impact of p53 Pro72 homozygous genotype in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep.* 2008 Mar;19(3):771-3.

Boley SE, Anderson EE, French JE, Donehower LA, Walker DB, Recio L. Loss of p53 in benzene-induced thymic lymphomas in p53<sup>+/-</sup> mice: evidence of chromosomal recombination. *Cancer Res* 2000 60:2831-5.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3:227–30.

Chen RH, Chang CT, Wang TY, Huang WL, Tsai CH, Tsai FJ. p53 codon 72 proline/arginine polymorphism and autoimmune thyroid diseases. *J Clin Lab Anal.* 2008;22(5):321-6.

Choi HR, Tucker SA, Huang Z, Gillenwater AM, Luna MA, Batsakis JG, et al. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol.* 2003 Feb;22(2):409-14.

Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 1996;383: 453-7.

Clurman BE, Porter P. New insights into the tumor suppression function of P27(kip1). *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:15158–60.

D'Amora P, Sato H, Girão MJ, Silva ID, Schor E. Polymorphisms in exons 1B and 1C of the type I interleukin-1 receptor gene in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2006 Sep;56(3):178-84.

de Carvalho CR, da Silva ID, Pereira JS, de Souza NC, Focchi GR, et al. Polymorphisms of p53, GSTM1 and GSTT1, and HPV in uterine cervix adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(6):590-3.

De Carvalho CV, Nogueira-De-Souza NC, Costa AM, Baracat EC, Girão MJ, D'Amora P, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17alpha (CYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol Endocrinol.* 2007 Jan;23(1):29-33.

Engelmark MT, Renkema KY, Gyllensten UB. No evidence of the involvement of the Fas 2670 promoter polymorphism in cervical cancer in situ. *Int J Cancer* 2004;112:1084–5.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997 Jun;24(2):235-58. Review.

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Eng J Med* 1994 331:1259-64.

Evan G, Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 17: 342–348.

Falconer H, D'Hooghe T, Fried G. Endometriosis and genetic polymorphisms. *Obstet Gynecol Surv.* 2007 Sep;62(9):616-28. Review.

Fernández RM, Noval JA, García-Lozano JC, Borrego S, Moliní JL, Antiñolo G. Polymorphisms in the promoter regions of FAS and FASL genes as candidate genetic factors conferring susceptibility to endometriosis. *Int J Mol Med.* 2005 May;15(5):865-9.

Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, et al. High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6380-5.

Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1042-7.

Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004 Nov 13-19;364(9447):1789-99.

Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* 2001;23:238–53.

Guo SW. Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies. *Mol Hum Reprod*. 2005 Oct;11(10):729-43.

Halme JA, Hammond MG, Hulka JF, Raj S, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 333–337.

Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995;15:2672–81.

Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol*. 1976 Jul;119(3):159-66.

Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Hsu CM, Lin CC, Tsai CH. Interleukin-2 receptor beta (IL-2R beta)-627\*C homozygote but not IL-12R beta 1 codon 378 or IL-18 105 polymorphism is associated with higher susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*. 2005 Aug;84(2):510-2.

Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Lin CC, Chen JM, Tsai CH. Glutathione S-transferase M1\*null genotype but not myeloperoxidase promoter G-463A polymorphism is

associated with higher susceptibility to endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2004 Oct;10(10):713-7.

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

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

Hsieh YY, Tsai FJ, Chang CC, Chen WC, Tsai CH, Tsai HD, et al. p21 gene codon 31 arginine/serine polymorphism: non-association with endometriosis. *J Clin Lab Anal.* 2001;15(4):184-7.

Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N. Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:645–51.

Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997;34:577–82.

Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 1997;34:577–82.

Hur SE, Lee JY, Moon HS, Chung HW. Polymorphisms of the genes encoding the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Korean women: no association with endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2005 Jan;11(1):15-9.

Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001 61:6350-5.

Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:557-82. Review.

Juo SH, Wu R, Lin CS, Wu MT, Lee JN, Tsai EM. A functional promoter polymorphism in interleukin-10 gene influences susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril*. 2008 Oct 17.

Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A, Otsuka T, Takeuchi T, Nagayama J, et al. A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:1183–8.

Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995;55:2266–9.

Kitawaki J, Koshiha H, Kitaoka Y, Teramoto M, Hasegawa G, Nakamura N, et al. Interferon-gamma gene dinucleotide (CA) repeat and interleukin-4 promoter region (-590C/T) polymorphisms in Japanese patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2004 Aug;19(8):1765-9. Epub 2004 May 27.

Kosugi Y, Elias S, Malinak LR, Nagata J, Isaka K, Takayama M, et al. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Apr;180(4):792-7.

Koufos A, Grundy P, Morgan K, Aleck KA, Hadro T, Lampkin BC, et al. Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5. *Am J Hum Genet* 1989;44:711–9.

Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Zhao M, Sato S, Takekoshi T, et al. Reduced expression of p27(Kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000;151:217–22.

Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998;83:2447–55.

Kupryjanczyk J, Bell DA, Yandell DW, Scully RE, Thor AD. p53 expression in ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1994 102:671-6.

Kuropkat C, Rudolph P, Frahm SO, Parwaresch R, Werner JA. Proliferation marker Ki-S11—a prognostic indicator for squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Virchows Arch* 1999;435:590–5.

Lai HC, Sytwu HK, Sun CA, Yu MH, Yu CP, Liu HS, et al. Single nucleotide polymorphism at Fas promoter is associated with cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 2003;103:221–5.

Lattuada D, Viganò P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M, Di Blasio AM. Analysis of the codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2004 Sep;10(9):651-4.

Lee GH, Choi YM, Kim SH, Hong MA, Oh ST, Lim YT, et al. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms with advanced stage endometriosis. *Hum Reprod*. 2008 Apr;23(4):977-81.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? 2006. *Cell Death Differ*. 13:1027–36

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.

Li G, Sturgis EM, Wang LE, Chamberlain RM, Spitz MR, El-Naggar AK, et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3996-4002.

Lin SR, Lee YJ, Tsai JH. Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 78:483-91.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Chevillat JC, Scheithauer Bw. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 1999;154:313–23. Review

Loging WT, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 8:1011-6.

Lowe S, Lin A. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21:485–495.

MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1995;5:127–56.

Manahan KJ, Taylor DD, Gercel-Taylor C. Clonal heterogeneity of p53 mutations in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001 19:387-94.

Masciullo V, Susini T, Zamparelli A, Bovicelli A, Minimo C, Massi D, et al. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in estrogen-related endometrial adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:5332-8.

Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 1995 Mar 15;9(6):650-62.

Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M and Rumi LS. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000;74:760-6.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, et al. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999;85:1011–7.

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–56.

Nakayama K, Toki T, Zhai YL, Lu X, Horiuchi A, Nikaido T, et al. Demonstration of focal p53 expression without genetic alterations in endometriotic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2001 20:227-31.

Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL, Dunselman GA. Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Apr;18(2):233-44. Review.

Nutt CL, Noble M, Chambers AF, Cairncross JG. Differential expression of drug resistance genes and chemosensitivity in glial cell lineages correlate with differential response of oligodendrogliomas and astrocytomas to chemotherapy. *Cancer Res* 2000 60:4812-8.

Omori S, Yoshida S, Kennedy SH, Negoro K, Hamana S, Barlow DH, et al. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene is not associated with endometriosis in a Japanese population. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 May;11(4):232-6.

Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet*. 1994 Jul 2;344(8914):28-9.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):682-5.

Piotrowski P, Lianeri M, Mostowska M, Wudarski M, Chwalinska-Sadowska H, Jagodzinski PP. Contribution of polymorphism in codon 72 of p53 gene to systemic lupus erythematosus in Poland. *Lupus*. 2008;17(2):148-51. *Lupus*. 2008;17(2):148-51.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. 1994 Jul 15;78(1):59-66.

Rodrigues FW, Arruda JT, Silva RE, Moura KK. TP53 gene expression, codon 72 polymorphism and human papillomavirus DNA associated with pterygium. *Genet Mol Res*. 2008;7(4):1251-8.



Sampson JA. Ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary) and implantation adenomas of endometrial type. *Boston Med Surg J* 1922; 186: 445–73.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obst Gynecol* 1927; 14: 442–69.

Schor E, da Silva ID, Sato H, Baracat EC, Girão MJ, de Freitas V. P27Kip1 is down-regulated in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):682-6.

Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;943:131-47. Review.

Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, et al. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2003;63 (15):4327–30.

Steiner MS, Zhang X, Wang Y, Lu Y. Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde. *Cancer Res* 2000 60:4419-25.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169–78.

Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Suzuki T, Hori S, Hayashi H, et al. Impact of circulating p53 autoantibody monitoring after endoscopic resection in mucosal gastric cancer. *Endoscopy* 2000 32:740-1.

Tempfer CB, Schneeberger C, Huber JC. Applications of polymorphisms and pharmacogenomics in obstetrics and gynecology. *Pharmacogenomics* 2004;5:57–65.

Teramoto M, Kitawaki J, Koshiba H, Kitaoka Y, Obayashi H, Hasegawa G, et al. Genetic contribution of tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene promoter (-1031, -863

and -857) and TNF receptor 2 gene polymorphisms in endometriosis susceptibility. *Am J Reprod Immunol.* 2004 May;51(5):352-7.

Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 1999;398:160-5.

Ueda M, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Takehara M, Yamaguchi H, et al. Fas gene promoter 2670 polymorphism in gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(Suppl. 1):179–182.

Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig.* 2006 Oct;13(7):467-76.

Vieira JO, da Silva ID, Higo PE, Nogueira-de-Souza NC, Gebrim LH. Study of p53 codon 72 polymorphism in patients with breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(4):364-7.

Vietri MT, Cioffi M, Sessa M, Simeone S, Bontempo P, Trabucco E, et al. CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in women affected with endometriosis. *Fertil Steril.* 2008 Oct 16.

Vietri MT, Molinari AM, Iannella I, Cioffi M, Bontempo P, Ardovino M, et al. Arg72Pro p53 polymorphism in Italian women: no association with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007 Nov;88(5):1468-9.

Vinatier D, Cosson M, Dufour P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000 Aug;91(2):113-25.

Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 May;96(1):21-34. Review.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. 2000. *Nature* 408:307–10

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. 2002. *Nat. Rev. Cancer* 2:594–604

Wang JY, Lin SR, Hsieh JS, Hsu CH, Huang YS, Huang TJ. Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res* 2001 21:513-20 .

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993;366:701-4.

Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasion M. Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet* 1999 354:218-9.

Zheng WQ, Zheng JM, Ma R, Meng FF, Ni CR. Relationship between levels of Skp2 and P27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy. *Steroids* 2005;70:770-4.

Zhou M, Gu L, Yeager AM, Findley HW. Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with a mutant p53 phenotype and absence of Bcl-2 expression. *Leukemia* 1998 12:1756-63.

## ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TÍTULO:

“Avaliação dos polimorfismos nos genes *TP53*, *P27* e *FAS* em mulheres com endometriose”

#### 2- OBJETIVO:

“Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo (como paciente do grupo de estudo ou grupo controle) que visa identificar polimorfismos nos genes que controlam ciclo celular e apoptose. Este estudo tem como objetivo verificar se existem possíveis alterações genéticas nos genes que fazem parte do controle do crescimento e morte celular programada (apoptose), a fim de, melhor entender a fisiopatologia da endometriose”.

#### DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS:

Para obtenção do DNA das células bucais, deve-se realizar o raspado bucal, seguido de bocheço com soro fisiológico.

#### 4- DESCONFORTOS E RISCOS:

Não há desconforto nem risco na realização da coleta de DNA de raspado bucal.

#### BENEFÍCIOS:

Não há benefício direto para a participante, pois, trata-se de estudo que visa identificar, o mecanismo de surgimento da endometriose e somente no final do estudo poder-se-á concluir a presença de algum benefício que servirá a toda a comunidade científica e posteriormente as mulheres portadoras da doença.

#### PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS:

Como não se trata de um estudo experimental clínico não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar.

#### GARANTIA DE ACESSO:

Estamos a sua disposição para qualquer informação relacionada à pesquisa ou qualquer problema relacionado a ela. Em qualquer etapa do estudo, a paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora principal, Cíntia Meirelles de Camargo Kosugi e o co-orientador, Dr. Eduardo Schor que podem ser encontrados no Departamento de Ginecologia no endereço: Rua Napoleão de Barros 715, 7º andar do Hospital São Paulo (telefones 5576-4100 ou 5576-4104).

Caso você tenha alguma dúvida ou consideração com relação aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, tel 5571-1062, Fax 5539-716 2 – e-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br).

#### 8- LIBERDADE:

A sua participação no estudo é totalmente voluntária e caso deseje, você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma necessidade de justificativa e sem nenhum prejuízo em seu tratamento que continuará sendo realizado normalmente.

#### 9- CONFIDENCIALIDADE:

Todas as informações colhidas e as identidades das pacientes serão mantidas em sigilo como informação confidencial.

#### 10- DIREITO DE INFORMAÇÃO:

As pacientes terão direito de serem mantidas atualizadas sobre os resultados parciais desta pesquisa.

#### 11- DESPESAS E COMPENSAÇÕES:

Não existem despesas pessoais para você em qualquer fase do nosso estudo, incluindo exames e consultas. Também não existirá compensação financeira relacionada a sua participação.

#### 12- DANOS PESSOAIS E TRATAMENTO:

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

#### 13- SIGILO:

A nossa equipe de pesquisadores se compromete a utilizar os dados e material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa denominada “*Avaliação dos polimorfismos nos genes TP53, P27 e FAS em mulheres com endometriose*”. Discuti com o pesquisador responsável pelo estudo (Cíntia Meirelles de Camargo Kosugi) sobre minha decisão em participar dessa pesquisa. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de benefícios que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse Serviço.

-----  
Assinatura da paciente/representante legal

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

-----  
Assinatura de testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

O material coletado e cultivado poderá futuramente ser utilizado para pesquisas que procurem desvendar novos aspectos relacionados a endometriose.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. A principal investigadora, Cíntia Meirelles de Camargo-Kosugi e o co-orientador Dr. Eduardo Schor que podem ser encontrados no endereço: Rua Napoleão de Barros, 715 - 7º andar – Secretária da Ginecologia, telefone: 5576-4100 ou 5576-4104. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar conj. 14, TEL: 5539-7162 ou 5571-1062, FAX: 5539-7162.

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Estou de acordo com minha participação por livre escolha. Tenho ainda o direito de recusa a qualquer momento se assim o desejar.

Sem mais,

Paciente: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



## Abstract

**Introduction:** Endometriosis is a benign gynaecological disease, defined as the presence of functional endometrial implants out of uterus, mainly in pelvis. Cell cycle and apoptosis disturbs could be associated with this disease as well as alterations in the genes that control. **Aim:** To investigate the possible association between the presence of the polymorphisms in the genes *TP53*: codons 11; 72; 248, *P27* (V109G) and *FAS* –A670G with endometriosis. **Methods:** Cross sectional case–control study was performed. Genomic DNA was extracted from cells collected from buccal swabs. The *TP53*: codons 11; 72; 248, *P27* (V109G) and *FAS* –A670G polymorphisms were investigated using the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in a hospital-based Brazilian population. **Results:** The *P53* gene, codon 11 (*P53\*11*) polymorphism study showed that mostly of women did not present the allelic variance ( $p=0,255$ ). The *P53* gene, codon 72 (*P53\*72*) polymorphism study presented significant differences between endometriosis and control groups ( $P=0,01$ ;  $OR=2,19$ ;  $95\% IC=1,196-4,039$ ). The *P53* gene, codon 248 polymorphism study showed that only one woman from endometriosis group presented heterozygosis to variate allele. The distribution of genotype and allele frequencies of p27 V109G polymorphism was significantly different between the endometriosis cases and healthy women ( $p = 0.016$  and  $0.002$ ). Finally, *FAS* gene polymorphism study showed any significant difference between groups ( $p=0,97$ ). **Conclusions:** *P53\*72* and *P27* polymorphisms studies could be associated with endometriosis.

## Quadro de Primers

Polimorfismos	Sequência de primers	Desnaturação (°C/seg)	Anelamento (°C/seg)	Extensão (°C/seg)	Endonuclease de restrição (°C/ hora)	Fragmento de DNA (tam. Em pares de base)
P53*11	F- CTTGGGTTGTGGTGAAACATTG; R- GTCAGTCCCATGAATTTTCGCT	94/30	55/30	72/45	TaqI 65°C por 0,45 hora	(Selvagem) 239+140 (Mutado) 379
P53*72	F-TCCCCCTTGCCGTCCCAA; R-CGTGCAAGTCACAGACTT	95/30	58/30	72/45	BstJI por 4 horas	(Selvagem) 278 (Mutado) 180+118
P53*248	F- TAGGTTGGCTCTGACTGTACCA; R-TGTGATGAGAGGTGGATGGGTA	94/30	58/30	72/45	HapII 85°C por 0,45 hora	(Selvagem) 184+89 (Mutado) 233
P27	F- TCG AGA CCC GGG AGA AAG; R- CCG CTA ACC CCG TCT GG	94/60	56,7/60	72/60	BglI por 3 horas	(Selvagem) 378+76 (Mutado) 262+116+76
FAS	F- CTA CCT AAG AGC TAT CTA CCG TTC; R- GGC TGT CCA TGT TGT GGC TGC	98/60	58/60	72/60	MvaI por 3 horas	(Selvagem) 233 + 98 (Mutado) 189 + 98 + 44

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)