

**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
GOIÁS
Câmpus Formosa

Licenciatura em Ciências Biológicas

Níve Áira Calazans Pinto

**Análise do marcador genético *GSTM1* em amostras de biópsia de mulheres
com endometriose**

Formosa-GO
2015



**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
GOIÁS
Câmpus Formosa

Nínive Áira Calazans Pinto

**Análise do marcador genético *GSTM1* em amostras de biópsia de mulheres
com endometriose**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, campus Formosa como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Ms. Ariane Bocaletto Frare
Coorientador: Dra. Katia Karina Verolli de O. Moura

Formosa – GO
2015

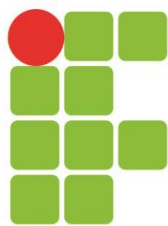
P659 Pinto, Nínive Áira Calazans

Análise do marcador genético GSTM1 em amostras de biópsia de mulheres com endometriose / Nínive Áira Calazans Pinto. – 2015.

44 f.; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Ms. Ariane Bocaletto Frare. – Trabalho de conclusão de curso (graduação). – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás, Campus Formosa, 2015.

1. Endometriose. 2. PCR. 3. glutathione S-transferase I. Pinto, Nínive Áira Calazans. II. Título.



**INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
GOIÁS
Câmpus Formosa

Ní nive Áira Calazans Pinto

Análise do marcador genético *GSTMI* em amostras de biópsia de mulheres com endometriose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, campus Formosa, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____/____/____

Por:

Membros da banca

Prof.^a Ms. Ariane Bocaletto Frare
Orientadora

Ms. Patrícia de Castilhos
Prof.^a Dept. de Biologia do IFG

Dr.^a Renata Alves da Mata
Prof.^a Dept. de Controle Ambiental e Saneamento do IFG

Dedico a todas as mulheres que lutam contra a endometriose, em especial dedico esse trabalho para Thaís Amaral e Sousa, uma mulher guerreira e persistente que conseguiu sair vitoriosa frente a essa doença ao realizar o sonho de ser mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é meu porto seguro!

Em segundo lugar, agradeço a minha querida orientadora, Ariane Bocaletto Frare por ter se disponibilizado a me orientar e ter me proporcionado a oportunidade realizar um bom trabalho. Obrigada pelos “puxões de orelha”, pelos sábios conselhos, e pela paciência em ensinar, aprendi muito! Sou eternamente grata!

Meus agradecimentos, também, se estendem ao professor Eder Silva de Brito, por ter me auxiliado com os testes estatísticos. Muito obrigada pelo seu carisma e pela sua ajuda!

Agradeço a minha família, em especial, a minha amada mãe, Juliana, e minha avó, Eunice, que sempre me apoiaram em todos os meus sonhos e projetos. Amo vocês!

Ao meu namorado Magnum, por fazer parte da minha vida, e por ser tão amável e prestativo.

Te amo!

SONETO ANTIGO

Responder a perguntas não respondo.
Perguntas impossíveis não pergunto.
Só do que sei de mim aos outros conto:
de mim, atravessada pelo mundo.

Toda a minha experiência, o meu estudo,
sou eu mesma que, em solidão paciente,
recolho do que em mim observo e escuto
muda lição, que ninguém mais entende.

O que sou vale mais do que o meu canto.
Apenas em linguagem vou dizendo
caminhos invisíveis por onde ando.

Tudo é secreto e de remoto exemplo.
Todos ouvimos, longe, o apelo do Anjo.
E todos somos pura flor de vento.

(Cecília Meireles)

RESUMO

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido funcional semelhante ao endométrio localizado fora da cavidade uterina, mais comumente no peritônio pélvico, nos ovários e septo retovaginal. Estima-se que ao menos 25% de todas as mulheres aos 30 anos apresentem endometriose e, entre estas, 30% a 50% que apresentam a doença são inférteis. Nesse estudo foram coletadas 49 amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com endometriose; e para formar o grupo controle foi coletado sangue de 44 pacientes sem nenhuma queixa relacionada à doença. As 93 amostras de DNA foram submetidas à PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando *primers* específicos para *GSTM1*, visando a detecção do polimorfismo presença/ausência do gene *GSTM1*. A idade média das pacientes com endometriose resultou em 33,32 anos, com desvio padrão (DP) 2,96. Já as pacientes do grupo controle apresentaram idade média de 37,93 anos, e o DP 11,03. Verificou-se que a frequência do gene *GSTM1* nulo no grupo endometriose (biópsia, 55%) foi 25% menor se comparado com o grupo controle (75%), sendo esta diferença não estatisticamente significativa, $p=0,07$. Nesse trabalho também comparamos as amostras de biópsia com amostras de sangue ($n=49$) que foram analisadas em outro estudo, mas que pertenciam às mesmas pacientes do grupo com endometriose considerado nesse trabalho. Foi averiguado que a frequência do gene *GSTM1* nas amostras de biópsia foi 4% menor se comparado às amostras de sangue, não sendo esta diferença estatisticamente significativa, com $p=0,8396$.

Palavras-chave: endometriose. PCR. glutathione S-transferase. *GSTM1*.

ABSTRACT

Endometriosis is characterized by the presence of functional tissue similar to the endometrium located outside the uterine cavity, most commonly in the pelvic peritoneum, ovaries and rectovaginal septum. It is estimated that at least 25% of all women age 30 show endometriosis and, among these, 30% to 50% to have the disease are infertile. In this study were collected 49 samples from biopsies of patients diagnosed with endometriosis; and to form the control group blood was collected from 44 patients with no complaints related to the disease. The 93 DNA samples were subjected to PCR (polymerase chain reaction) using primers specific for *GSTM1*, aiming to detect polymorphism presence / absence of the *GSTM1* gene. The average age of patients with endometriosis resulted in 33.32 years, with standard deviation (SD) 2.96. As for the control group had a mean age of 37.93 years, and the DP 11,03. Was found that the frequency of the *GSTM1* gene null in the endometriosis group (biopsy, 55%) was 25% lower compared with the group control (75%), and this difference was not statistically significant, $p = 0,07$. In this work we also compared the biopsy samples with blood samples ($n = 49$) were analyzed in another study, but belonging to the same patients group with endometriosis considered in this work. It was established that the frequency of *GSTM1* gene in biopsy samples was 4% lower compared to the blood samples, which is not statistically significant, with $p = 0.8396$.

Keywords: endometriosis. PCR. glutathione S-transferase. *GSTM1*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência nucleotídica dos primers GSTM1	24
Tabela 2 - Protocolo para a amplificação do polimorfismo GSTM1	24
Tabela 3 - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers GSTM1	25
Tabela 4 - Comparação das variáveis das idades médias das pacientes com endometriose (biópsia) e controle (sem endometriose).	26
Tabela 5 - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 entre os grupos de biópsia e controle.....	26
Tabela 6 - Distribuição dos polimorfismos GSTM1 entre os grupos de biópsia e sangue.....	27
Tabela 7 - Distribuição dos genes GSTM1 entre o grupo endometriose fértil (biópsia) e controle.	28
Tabela 8 - Distribuição dos genes GSTM1 entre o grupo endometriose infértil (biópsia) e controle.	28
Tabela 9 - Comparação da variável etnia com o polimorfismo GSTM1 no grupo com endometriose (biópsia) e controle.	29
Tabela 10 - Comparação do uso de contraceptivo nos grupos de mulheres com endometriose e férteis (Biópsia) e o grupo controle (Cont).....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplo de possível mecanismo para o metabolismo de xenobióticos	19
Figura 2 - Deleção do GSTM1	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Endometriose	12
1.2	Teorias sobre o surgimento da endometriose	13
1.2.1	Teoria da menstruação retrógrada	13
1.2.2	Teoria da metaplasia celômica	13
1.2.3	Teoria hipótese Iatrogênica	14
1.2.4	Teoria dos restos embrionários	14
1.2.5	Teoria da disseminação linfática e hematogênica	14
1.3	Endometriose e o câncer	14
1.4	Tipos de endometriose	15
1.4.1	Endometriose peritoneal ou superficial	15
1.4.2	Endometriose ovariana	15
1.4.3	Endometriose pélvica profunda	15
1.5	Sintomatologia	16
1.6	Diagnóstico	16
1.7	Endometriose e infertilidade	16
1.8	Endometriose e genética	17
1.9	Sistema Glutathione S-transferase (GSTs)	18
1.9.1	<i>GSTM1</i>	19
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Geral	22
3.2	Específicos	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Seleção das pacientes	23
4.2	Coleta do material biológico	24
4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
4.4	Análise estatística	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO	35
8	GLOSSÁRIO	36
9	REFERÊNCIAS	37
	ANEXO A – QUESTIONÁRIO	42
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose

A endometriose é doença inflamatória mediada pelo estrogênio, definida como a presença de tecido endometrial fora da cavidade e parede uterina, que afeta cerca de 10 a 15% das mulheres no período reprodutivo e 20% a 40% das mulheres que procuram tratamento por infertilidade. Os locais mais frequentes de acometimento dessa patologia são peritônio pélvico e os ovários. Os principais sintomas das mulheres acometidas pela endometriose são: dor pélvica crônica, dispareunia e infertilidade. (GIUDICE; KAO, 2004)

Essa doença envolve aspectos hormonais, imunes e genéticos (LECKE, 2006). Fatores ambientais apresentam papel comum em todas as enfermidades, e provavelmente também estão envolvidos com a endometriose, devido ao mecanismo genético ser considerado poligênico/ multifatorial (BISCHOFF; SIMPSON, 2000). O estresse oxidativo tem sido apontado como fator potencial envolvido na fisiopatologia de endometriose (NAKATA et. al, 2004).

A endometriose é descrita como uma doença benigna do aparelho genital feminino; sendo esta analisada pela primeira vez, por Rokitansky (1869) em material de necropsia (JANSEN; RUSSEL, 1986; MACHADO et al., 2001; PODGAEC et al., 2007). O surgimento de focos de tecido endometrial com características glandulares e/ou estromais similares aos da cavidade uterina em localizações distintas da região endometrial, caracterizam a endometriose (GIORDANO, 1998).

Essa doença é uma das principais causas de publicações científicas na área ginecológica, devido ao aumento do número de casos e pelo fato de que seu tratamento e diagnóstico ainda são incertos (ABRÃO; PODGAEC; DIAS, 2007). Esse aumento de incidência da endometriose é causado pela mudança dos hábitos femininos; as mulheres têm tido filhos com idades mais avançadas, e depois da primeira gestação demoram um período maior para terem outros filhos; como consequência ficam expostas por mais tempo ao

estrogênio e à maior frequência de menstruações (MACHADO et al., 2001). A epidemiologia da endometriose não é muito conhecida, já que não existem muitos estudos para essa finalidade; visto que há fatores complexos relacionados ao seu diagnóstico tanto clínico, como anatômico patológico e cirúrgico (CHAMIÉ, 2008).

1.2 Teorias sobre o surgimento da endometriose

A teoria mais aceita para explicar a endometriose é a da menstruação retrógrada, em que ocorre um refluxo do endométrio através das trompas de Falópio com implantação subsequente na cavidade peritoneal e no ovário. Essa teoria esclarece o surgimento da endometriose em cicatriz de cesáreas ou após histerectomias. No entanto, outras teorias foram propostas, como a da metaplasia celômica, dos restos embrionários, da disseminação linfática e hematogênica, a hipótese iatrogênica, entre outras (ABRÃO; PODGAEC; DIAS, 2007; MACHADO et al., 2001; SAMPSON, 1927).

1.2.1 Teoria da menstruação retrógrada

A teoria da menstruação retrógrada postula que ocorre o implante de células endometriais na cavidade abdominal, devido ao refluxo do sangue proveniente da menstruação (SAMPSON, 1921). Bricou, Batt e Chapron (2008), confirmaram a teoria de Sampson, ao verificarem que a distribuição dos implantes de células endometriais se porta de forma assimétrica e está relacionada com o fluxo do líquido peritoneal e a anatomia abdominopélvica.

1.2.2 Teoria da metaplasia celômica

Essa teoria afirma que o epitélio peritoneal pode ser "convertido" no tecido endometrial, isso pode ser devido à inflamação crônica ou irritação química do sangue menstrual refluído; ou seja, o epitélio celômico é o antepassado comum de células do endométrio e do peritônio, permitindo assim, a transformação de um tipo de célula para outra

(AGARWAL; SUBRAMANIAN, 2010). O desenvolvimento da endometriose em mulheres com agenesia uterina é explicado por essa teoria (MACHADO et al., 2001).

1.2.3 Teoria hipótese Iatrogênica

Sugerida por Greenhill, em 1942, essa teoria diz que implantes de endometriose localizados fora da pelve podem ocorrer em tecido celular subcutâneo de cicatrizes cirúrgicas ou adjacências, seguindo procedimentos de obstetrícia e ginecologia, sendo mais corriqueiros após procedimentos realizados durante a gestação (ABRÃO; MELO, 1998; NOMINATO et al., 2007).

1.2.4 Teoria dos restos embrionários

Essa teoria levanta a hipótese de que os restos de Müller (restos embrionários) podem se diferenciar em tecido endometrial. As circunstâncias em que isso ocorre não são claras, mas, uma vez que o endométrio está presente, ele causará sintomas de uma forma recorrente.(AGARWAL; SUBRAMANIAN, 2010).

1.2.5 Teoria da disseminação linfática e hematogênica

Foi proposta pela primeira vez por Halban (1924) , que se baseou no achado de tecido endometrial microscópico em vasos linfáticos e linfonodos. Mais tarde, em 1927, Sampson relatou a via sanguínea para o transporte de tecido endometrial. Por falta de estudos essa teoria não teve muito destaque (ABRÃO; MELO, 1998).

1.3 Endometriose e o câncer

Mesmo que a endometriose seja atendida como uma doença benigna, ela compartilha determinadas características comuns com as células malignas, que são: o crescimento descontrolado, invasão local e metástases à distância (MUNKSGAARD; BLAAKAER, 2012). Anomalias na resposta imune e alterações genéticas, bem como inflamação em mulheres com endometriose, pode predispor-las a ter câncer e infecções (GEMMILL et al., 2010; XIAO et al., 2012).

1.4 Tipos de endometriose

A classificação para a endometriose é feita de acordo com os lugares acometidos e os tipos de lesões que acontecem com base no estágio da doença. Desta maneira, a endometriose é dividida em: peritoneal, ovariana e pélvica profunda (NISOLLE; DONNEZ, 1997).

1.4.1 Endometriose peritoneal ou superficial

Ocorre quando as lesões endometriais se espalham pelo peritônio, caracterizando-se por incidir de modo progressivo. O aparecimento de lesões com uma superfície vermelho claro, são evidências das manifestações iniciais, devido a formação de novos vasos sanguíneos. Esse estágio ainda pode progredir para lesões brancas bem marcadas e em seguida ter características maduras com uma cor “negra”. devido à retenção de sangue depositado na superfície peritoneal. Estima-se que essa progressão da endometriose peritoneal ocorra no prazo de dez anos, a partir do início da doença (FRASER, 2008).

1.4.2 Endometriose ovariana

Endometriose do ovário pode apresentar-se de diferentes formas, como: lesões muito prematuras, placas com adesões de livre flutuação, lesões não-císticas profundas e cistos escuros com aderências (HUGHESDON, 1957).

1.4.3 Endometriose pélvica profunda

A endometriose profunda infiltra-se no peritônio mais que 5mm, e comumente afeta a vagina, ligamento uterossacro, bexiga, ureter e intestino. Nódulos de endometriose pélvica profunda pode desenvolver-se no septo reto-vaginal. Estes tendem a conter uma grande quantidade de tecido fibroso e têm aparências histológicas semelhantes a adenomiose (CARDOSO et al., 2009; FRASER , 2008).

1.5 Sintomatologia

Os principais sintomas clínicos da endometriose incluem dismenorrea, dor pélvica cíclicas ou acíclicas, dispareunia de profundidade, infertilidade, podendo ser ainda, assintomática. Os sintomas gastrintestinais graves, como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual também podem ser manifestados (BULUN, 2009; MACER; TAYLOR, 2012; SAGAE, 2005). A endometriose também pode gerar certas complicações como: sangramento, com a possibilidade de formar faixas de tecido cicatricial (aderências) que podem anexar aos órgãos na pelve e no abdômen; infertilidade; aumento do risco de aborto ou parto prematuro; rompimento e sangramento dos cistos, causando dor intensa; e aumento do risco de certos tipos de cânceres, em particular do ovário (AGARWAL; SUBRAMANIAN, 2010).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da endometriose é eminentemente cirúrgico sendo feito através da laparoscopia (considerada uma técnica invasiva) ou laparotomia. A laparoscopia persiste em ser o método mais usado e garantido para o diagnóstico dessa doença sendo considerada uma técnica de ouro (ABRÃO et al., 2003; BENAGIANO, 2011; BROSENS et al., 2004). O conhecimento que a medicina tem sobre endometriose é amparado especialmente pelos estudos clínicos, laboratoriais, incluindo os imunológicos e os obtidos pela videolaparoscopia. (ABRÃO et al., 2003).

1.7 Endometriose e infertilidade

De acordo com a ARSM (2013), a infertilidade consiste na incapacidade de engravidar após pelo menos 12 meses ao praticar relação sexual (coito) sem proteção. Mulheres acometidas pela endometriose podem apresentar diversos sintomas, como: dispareunia, dismenorrea, os sintomas da bexiga / intestino, dor pélvica crônica e infertilidade (MACER; TAYLOR, 2012). Estima-se que 5 a 25%, das mulheres portadoras da endometriose possuem falta de ovulação ou dificuldade para ovular. Sem contar que, 30 a 50% de mulheres com endometriose são estéreis (D' HOOGHE et al., 2003).

Se a mulher com endometriose deseja engravidar, é indispensável que a mesma realize um procedimento cirúrgico, visto que nenhum método farmacológico tem sido indicado para restituir ou manter a fertilidade (JACKSON; TELNER, 2006). A intervenção cirúrgica inclui a retirada de lesões de endometriose, remoção de cistos de endometriose e divisão de aderências (BENAGIANO, 2011).

A infertilidade associada à endometriose pode ser complexa, já que os sintomas variam de paciente para paciente. Portanto, nem todos respondem a terapias, da mesma maneira. No entanto, a investigação sobre as modalidades terapêuticas para a infertilidade associada à endometriose deve continuar, especialmente no que diz respeito ao direcionamento dos mecanismos moleculares (STILLEY; et al., 2012; MACER; TAYLOR, 2012).

1.8 Endometriose e genética

A endometriose é comumente considerada como uma doença sensível a esteróides, no entanto, as falhas do sistema imunológico, assim como predisposição genética e epigenética provavelmente desempenham um papel igualmente importante na determinação se uma mulher irá desenvolver esta patologia, portanto a endometriose é uma doença genética de herança poligênica / multifatorial (BULUN, 2009; BISCHOFF; SIMPSON, 2000).

O estresse oxidativo tem sido apontado como fator potencial envolvido na fisiopatologia de endometriose, já foi observado no endométrio de mulheres acometidas por essa patologia a produção de espécies reativas de oxigênio pelo fluido peritoneal juntamente com a expressão alterada de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo. A desmoderada produção de espécies reativas de oxigênio pode também ser resultado da exposição a compostos químicos que rompem o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (NAKATA et al., 2004).

A atividade metabólica é o principal mecanismo para manter a homeostasia durante a exposição dos organismos aos xenobióticos, produtos químicos como: medicamentos, pesticidas, cosméticos, fragrâncias, aditivos alimentares; que em sua maioria são metabolizados no corpo para torná-los menos tóxicos para o mesmo (OCIOSO; GONZALEZ,

2007). O equilíbrio das taxas de absorção e eliminação dos xenobióticos tem um papel importante na prevenção de danos no DNA (HATAGIMA, 2002). É possível que polimorfismos genéticos em enzimas envolvidas na produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio, bem como naquelas que participam da ativação e detoxificação de compostos exógenos (xenobióticos), modulem os níveis de biomarcadores de dano oxidativo (HONG *et al.*, 2002). Diferenças genéticas na regulação, expressão e atividade dos genes envolvidos na metabolização dos xenobióticos pode ser o fator crucial na susceptibilidade a certos tipos de doenças (ROSSI; CONFORTI, 2000). Polimorfismos em genes do biometabolismo têm sido identificados em inúmeras populações e relacionados com neoplasias de pulmão, fibrose cística, bronquite crônica e endometriose (LINHARES *et al.*, 2005).

1.9 Sistema Glutathione S-transferase (GSTs)

Segundo Rossi e Conforti (2000), 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), que codificam numerosas enzimas catalizadoras de uma multiplicidade de reações químicas e metabolizam um grande número de substratos exógenos e endógenos, como lipídeos e esteróides. Em contraposição, as reações de fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno, por meio da glutathione S-transferase (GSTs), UDP-glucoroniltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos de fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção.

Reina e colaboradores (2002), desenvolveram um modelo que esquematiza as fases I e II do metabolismo oxidativo (Figura 1). A fase I representa a oxidação do xenobiótico (RCH=CH₂) através da ação, por exemplo, de enzimas da família dos citocromos (CIT); já a fase II demonstra a ação de famílias de enzimas (ex: glutathione-S-transferase, GST) encarregadas de adicionar um grupo hidrofílico (glutathione, GSH) facilitador da excreção.

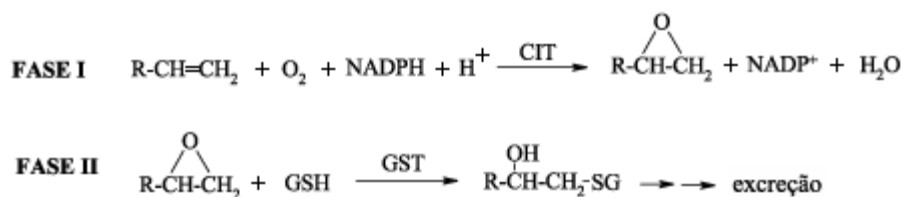


Figura 1- Exemplo de possível mecanismo para o metabolismo de xenobióticos (REINA, et al 2002).

As GSTs compõem uma superfamília de enzimas com múltiplas funções, que estão envolvidas na detoxificação de muitas substâncias químicas, abrangendo algumas carcinogênicas, como o benzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, através da conjugação destas substâncias com uma molécula de glutathione endógena (ROHR et al., 2004). Oito classes de enzimas GST foram identificadas em humanos: Alfa, Mu, Pi, Teta, Capa, Zeta, Ômega, e Sigma (α , μ , π , θ , κ , ζ , ω e σ) (HAYES; PULFORD, 1995; GUTHENBERG et al., 1986). Polimorfismos em genes da família GSTs, possivelmente alteram sua expressão e funcionalidade, presume-se que isso pode afetar o seu efeito sobre a ativação cancerígena, de desintoxicação e reparo do DNA (GONG et al., 2012).

1.9.1 *GSTM1*

Dentre as enzimas GSTs mais estudadas estão as *GSTT1* e *GSTM1*. Este último codifica a enzima citosólica GST- μ e não sintetiza seu produto proteico devido a grande deleção no gene (BARANOVA et al., 1997; REBBECK, 1997). Alelos nulos em homozigose no *GSTM1* e *GTT1* podem funcionar sinergicamente, fazendo com que ocorra desintoxicação ineficiente dos compostos intermediários, que foram produzidos durante o estresse. Se não for rapidamente metabolizado, os compostos tóxicos intermediários resultam em aumento de danos para os genes reguladores da célula hospedeira, se o composto em questão é uma substância cancerígena, o polimorfismo pode conferir aumento do risco de câncer (BISCHOFF; SIMPSON, 2004).

Foram identificados três polimorfismos do gene *GSTM1*, que está localizado no cromossomo 1p13.3; um desses polimorfismos é uma deleção que resulta na falta de um produto funcional do gene (*GSTM1* nulo) (Figura 2). Pessoas com deleção homozigótica do *GSTM1* (*GSTM1* nulo) não mostram atividade GST- μ (PARL, 2005; REBBECK, 1997).

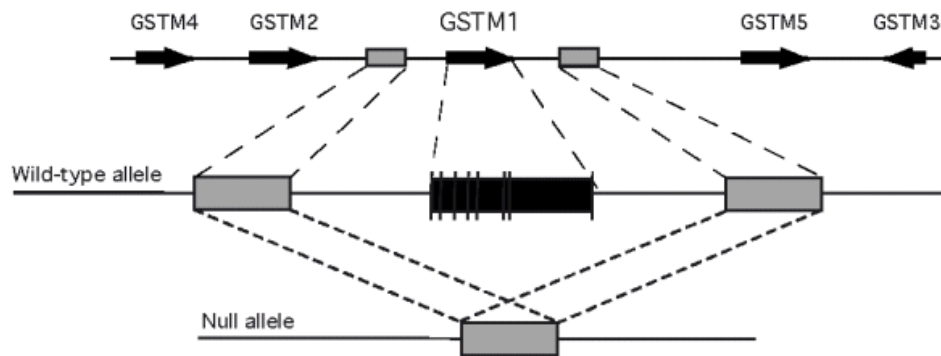


Figura 2 - Deleção do GSTM1(PARL, 2005).

O gene *GSTM1* é organizado como 5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3' (parte superior do diagrama da figura 2). O gene *GSTM1* mostrado na figura acima, em caixa preta, é composto por 8 éxons, que variam em tamanho 36-112 pb (pares de base), enquanto os íntrons variam de 87 a 2641 pb. O *GSTM1* é incorporado em uma região com homologies extensas e fica entre duas regiões de 4.2 kb (1.000 pb) quase idênticas (caixas cinzas). O *GSTM1* nulo surge por recombinação homóloga dessas duas regiões de 4.2-kb, o que resulta em uma deleção de 16 kb que abrange todo o *GSTM1* (parte inferior da figura). O ponto de eliminação não pode ser localizado com exatidão por causa da elevada identidade de sequências entre as repetições (PARL, 2005).

Diversos trabalhos publicados, têm analisado a frequência do *GSTM1* nas pacientes com endometriose e controle a partir de amostras de sangue (HUANG et al., 2010; MATSUZAKA et al., 2012; TRABERT et al., 2011). Nesse estudo, buscamos saber se o local da coleta das amostras interfere na expressão do *GSTM1*; e para verificarmos tal hipótese, coletamos amostras de biópsias das pacientes com endometriose para compararmos com a frequência obtida a partir de amostras de sangue, relatada por Frare (2011), que analisou as mesmas pacientes consideradas nesse estudo.

2 JUSTIFICATIVA

Como a endometriose é uma patologia que se manifesta em 10 a 15% das mulheres em idade fértil, a qualidade de vida destas mulheres é gravemente afetada devido aos sintomas debilitantes como dismenorreia, dispareunia e a redução da fertilidade, geralmente associados à essa enfermidade.

Trabalhos comprovam que a presença da endometriose compromete e muito a qualidade física e emocional da paciente e que o tempo médio de diagnóstico da endometriose gira em torno de sete anos. Como a doença possui um caráter progressivo, esse tempo até que se faça o diagnóstico compromete tanto a qualidade de vida da paciente como a sua capacidade de engravidar.

Como a endometriose pode estar relacionada com as pacientes com infertilidade sem causa aparente, é comum na prática ambulatorial encontrar pacientes com dificuldade de engravidar e apresentando endometriose de grau leve ao passo que outras com graus mais avançados da doença e sem obstrução tubária conseguem engravidar mais rapidamente. Por isto torna-se importante o auxílio diagnóstico utilizando-se marcadores moleculares para diagnóstico preventivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Como objetivo geral, o presente estudo visa analisar se o local da coleta das amostras interfere na expressão do *GSTMI*.

3.2 Específicos

- Analisar a frequência do *GSTMI* em um grupo diagnosticado com endometriose, a partir de amostras de biópsia e comparar com o grupo controle, sem diagnóstico da patologia.
- Comparar a frequência do *GSTMI* do grupo diagnosticado com endometriose, a partir de amostras de biópsia com a frequência obtida a partir de amostras de sangue de outro trabalho, que analisou as mesmas pacientes do grupo com endometriose considerado nesse estudo.
- Analisar as características clínicas e epidemiológicas das pacientes portadoras de endometriose comparadas com pacientes sem endometriose, determinando a incidência deste possível marcador, na doença, sua relação com a severidade dos sintomas e com a infertilidade.
- Analisar a utilização do gene GST (especificamente o *GSTMI*), como um marcador genético, no auxílio diagnóstico da endometriose.

4 METODOLOGIA

Foram avaliadas 49 pacientes, atendidas pelo corpo clínico da Clínica Fértil – Centro de Medicina Fetal e Reprodução Humana em Goiânia-GO. Foram selecionadas histologicamente a partir de biópsia durante cirurgia videolaparoscópica, sendo posteriormente agrupadas como férteis ou inférteis. Para formar o grupo controle foi coletado sangue periférico de 44 mulheres acima de 27 anos, com pelo menos um filho e sem nenhuma queixa relacionada à endometriose. O projeto para coleta da amostra foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com número 0126.0.168.000-08.

Critérios de inclusão:

- 1) - Diagnóstico histológico de endometriose após videolaparoscopia;
- 2) - Idade entre 20 e 40 anos.

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.

4.1 Seleção das pacientes

A pré-seleção das pacientes foi feita a partir do cadastro de pacientes com indicação de videolaparoscopia diagnóstica com suspeita de endometriose. Foram incluídas apenas as com diagnóstico histológico confirmado.

As pacientes foram convidadas a participar da pesquisa e em seguida foi realizada uma anamnese, porém específica para a pesquisa (anexo A) sendo solicitado à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B).

4.2 Coleta do material biológico

As 49 amostras de biópsia foram coletadas de pacientes submetidas à cirurgia de laparoscopia e armazenadas em tubos de 1,5 ml, sendo que a extração dos fragmentos de biópsia ocorreu durante o ato operatório. Todas as 93 amostras (incluindo as 44 do grupo controle) foram devidamente identificadas e guardadas a -20°C no Núcleo de Pesquisa Replicon PUC Goiás para posterior análise.

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para detecção dos polimorfismos do gene *GSTM1*, as 93 amostras específicas foram submetidas à amplificação por reação em cadeia da polimerase (*PCR-Polymerase Chain Reaction*) usando *primers* específicos para *GSTM1*, visando a detecção do polimorfismo presença/ausência do gene *GSTM1* (tabela 1). O volume de 25 µL, foi utilizado para o processo de amplificação (tabela 2); e a condição de ciclagem está resumida na tabela 3 (FRARE, 2011).

<i>GSTM1</i>	F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb
--------------	---	-------

Tabela 1 - Sequência nucleotídica dos primers *GSTM1* (HUANG et al, 2010).

Reagentes	[] Reagentes	Vol. p/ 1 Amostra
Tampão	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2 µL
Taqpolimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer Fw	20 pM	1,0 µL
Primer Rev	20 pM	1,0 µL
H ₂ O Mili Q qsp 25µL	---	15,2 µL
DNA amostra	200 ng/µL	2 µL
Volume final		25 µL

Tabela 2 - Protocolo para a amplificação do polimorfismo *GSTM1* (FRARE, 2011).

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	94°C	5	1
	94°C	1	
Amplificação cíclica	57°C	90 seg	35
	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	59 min	

Tabela 3 - Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers GSTM1 (FRARE, 2011)

4.4 Análise estatística

Utilizamos o teste Mann-Whitney para a comparação das idades entre o grupo endometriose e controle. O teste χ^2 ou o teste de Fisher foi realizado para comparar os grupos de pacientes em questão. O programa BioEstat versão 5.0 foi utilizado para fazer avaliação estatística, onde valores de P (nível de significância do teste) menores ou iguais a 0,05 indicam que há diferença com relação à distribuição entre os grupos comparados (FRARE, 2011).

5 RESULTADOS

Por meio do questionário aplicado (anexo A), calculou-se a idade média das pacientes com endometriose (biópsia) e do grupo controle. O que resultou em uma idade média de 33,32 anos, com desvio padrão (DP) 2,96. Já as pacientes do grupo controle apresentaram idade média de 37,93 anos, e o DP 11,03. Estatisticamente, houve uma diferença significativa entre o grupo endometriose e o controle ($p=0,0234$, tabela 4).

	N	Idade Média	DP	P ^α
Endometriose	49	33,32	2,96	0,02
Controle	44	37,93	11,03	

P^α valor do teste Mann Whitney, $P \leq 0,05$.

N (número de pacientes)

Tabela 4 - Comparação das variáveis das idades médias das pacientes com endometriose (biópsia) e controle (sem endometriose).

As frequências polimórficas do gene *GSTM1* no grupo de mulheres com endometriose (biópsia) e no grupo controle foram analisadas. No grupo de mulheres com endometriose ($n=49$) foi constatado 45% (22/49) com presença do gene *GSTM1* e 55% (27/49) com ausência do *GSTM1*. Já no grupo controle ($n=44$), foi detectado 25% (11/44) de presença do gene *GSTM1* e 75% (33/44) de ausência. Verificou-se que a frequência do gene *GSTM1* nulo no grupo endometriose (biópsia, 55%) foi 25% menor se comparado com o grupo controle (75%), sendo esta diferença não estatisticamente significativa, $p=0,0742$ (tabela 5).

Variável	biópsia		Controle		X ²	GL	P ^α
	%	N	%	N			
<i>GSTM1</i>	45	22	25	11			
<i>GSTM1</i> nulo	55	27	75	33	4,0094	1	0,0742
Total	100	49	100	44			

P^α valor do teste χ^2

N (número de pacientes)

Tabela 5 - Distribuição dos polimorfismos *GSTM1* entre os grupos de biópsia e controle.

Na tabela 6 comparou-se as amostras de biópsia (n=49) e sangue (n=49) do grupo de pacientes com endometriose, avaliando as mesmas segundo a presença e ausência do gene *GSTM1*. A presença desse gene foi encontrada em 45% (22/49) do grupo de mulheres com endometriose (biópsia), e com ausência do mesmo em 55% (27/49). No grupo com endometriose (sangue), a presença do *GSTM1* teve frequência de 49% (24/49), com ausência do mesmo de 51% (25/49). Foi constatado que a frequência do gene *GSTM1* no grupo com endometriose (biópsia) foi 4% menor se comparado ao grupo com endometriose (sangue), sendo esta diferença não estatisticamente significativa, com $p=0,8396$.

Variável	biópsia		sangue		X ²	GL	P ^α
	%	N	%	N			
<i>GSTM1</i>	45	22	49	24			
<i>GSTM1</i> nulo	55	27	51	25	0,1639	1	0,8396
Total	100	49	100	49			

P^α valor do teste χ^2

N (número de pacientes)

Tabela 6 - Distribuição dos polimorfismos *GSTM1* entre os grupos de biópsia e sangue.

Quando analisamos a frequência genotípica do gene *GSTM1* no grupo de mulheres com endometriose (fértil) e controle, foi verificado a presença do *GSTM1* em 44% (10/23) do grupo endometriose e fértil, 56% (13/23) *GSTM1*/nulo. No grupo controle, 25% (11/44) das pacientes apresentavam o gene, e 75% (33/44) apresentavam ausência do *GSTM1*. Estatisticamente, não houve uma diferença significativa entre o grupo endometriose (fértil) e o controle, $p=0,2038$ (tabela 7).

Variável	biópsia		controle		X ²	GL	P ^α
	%	N	%	N			
<i>GSTM1</i>	44	10	25	11			
<i>GSTM1</i> nulo	56	13	75	33	2,4	1	0,2038
Total	100	23	100	44			

P^α valor do teste χ^2

N (número de pacientes)

Tabela 7 - Distribuição dos genes *GSTM1* entre o grupo endometriose fértil (biópsia) e controle.

Na tabela 8 o grupo de pacientes com endometriose e infértil (biópsia) e o grupo controle foram avaliados segundo a presença e ausência do gene *GSTM1*. A presença desse gene foi encontrada em 46% (11/24) do grupo de mulheres com endometriose e infértil, *GSTM1* nulo em 54% (13/24). No grupo controle a presença do *GSTM1* teve frequência de 25% (11/44), do *GSTM1* nulo foi de 75% (33/44). Foi constatado que a frequência do gene *GSTM1* foi aproximadamente 2 vezes maior no grupo endometriose e fértil (46%) comparado ao grupo controle (25%), sendo esta diferença não estatisticamente significativa, com p=0,1379.

Variável	biópsia		controle		X ²	GL	P ^α
	%	N	%	N			
<i>GSTM1</i>	46	11	25	11			
<i>GSTM1</i> nulo	54	13	75	33	3,080	1	0,1379
Total	100	24	100	44			

P^α valor do teste χ^2

N (número de pacientes)

Tabela 8 - Distribuição dos genes *GSTM1* entre o grupo endometriose infértil (biópsia) e controle.

Analizamos o polimorfismo *GSTM1* com relação à etnia, sendo que, observamos no grupo com endometriose (biópsia, n= 49) 40 mulheres que se declararam brancas, 7 negras e 3 não responderam. No grupo controle (n=44) 28 se disseram brancas e 5 negras, sendo que, 9 se classificaram como pardas e 2 não responderam. (tabela 9)

No grupo de mulheres brancas com endometriose observou-se as frequências do polimorfismo *GSTM1* em 43% (17/40) e 57% (23/40) do *GSTM1* nulo. No grupo de mulheres negras com endometriose foi detectado 57% (4/7) de frequência do *GSTM1* e 43% (3/7) do *GSTM1* nulo. A frequência do *GSTM1* foi aproximadamente 1,33 vezes menor no grupo de mulheres brancas (43%) comparado ao grupo de mulheres negras (57%), contudo não foi encontrado diferença estatisticamente significativa, sendo $p=0,7509$.

No grupo controle foi encontrado 21% (6/28) de frequência do *GSTM1* e 79% (22/28) de *GSTM1* nulo nas pacientes brancas. No grupo controle composto por mulheres negras a frequência do *GSTM1* foi de 0% (0/4) e 100% (4/4) de *GSTM1* nulo. O grupo composto por mulheres pardas foi encontrado 55% (5/9) de frequência do *GSTM1* e 45% (4/9) de *GSTM1* nulo.

A frequência do *GSTM1* foi aproximadamente 2,62 vezes maior no grupo de mulheres pardas (55%) comparado ao grupo de mulheres brancas (21%), e 21 vezes maior se comparado ao grupo de pacientes negras (0%), não sendo estas diferenças estatisticamente significantes, $p=0,058$.

Grupos/ Variáveis	Cor						X ²	GL	P ^a
	Branca		Parda		Negra				
	%	N	%	N	%	N			
Biópsia									
<i>GSTM1</i>	43	17	0	0	57	4	0,51	1	0,7509
<i>GSTM1</i> nulo	57	23	0	0	43	3			
Total	100	40	0	0	100	7			
Controle									
<i>GSTM1</i>	21	6	55	5	0	0	5,66	2	0,058
<i>GSTM1</i> nulo	79	22	45	4	100	4			
Total	100	28	100	9	100	4			

P^a valor do teste χ^2

N (número de pacientes)

Tabela 9 - Comparação da variável etnia com o polimorfismo *GSTM1* no grupo com endometriose (biópsia) e controle.

Analisamos o polimorfismo *GSTM1* com relação ao uso de contraceptivo, no grupo endometriose fértil (biópsia, n=23), 14 mulheres confirmaram o uso de contraceptivo e 9 mulheres confirmaram que não usam contraceptivo; quando analisado o polimorfismo *GSTM1* foi detectado 64% (9/14) e 36% (5/14) de *GSTM1* nulo. No grupo controle 30 mulheres negaram o uso de contraceptivo e 14 confirmaram o uso do mesmo, foi encontrado 30% (9/30) do *GSTM1* e 70% (21/30) de *GSTM1* nulo. A frequência do *GSTM1* foi aproximadamente 2,13 vezes maior no grupo de mulheres com endometriose fértil 64% (9/14) comparado ao grupo controle 30% (9/30), houve uma diferença estatisticamente significante entre estes grupos com relação ao *GSTM1*, sendo $p=0,0202$ (tabela 10).

Grupos/ Variáveis	Contraceptivo							P ^α
	Biópsia		Cont		OR	Min	Max	
	%	N	%	N				
	Uso de anticoncepcional							
<i>GSTM1</i>	64	9	14	2	10,8	1,69	68,93	0,0202
<i>GSTM1</i> nulo	36	5	86	12				
Total	100	14	100	14				
	Não usa anticoncepcional							
<i>GSTM1</i>	33	3	30	9	1,16	0,23	5,72	0,8245
<i>GSTM1</i> nulo	67	6	70	21				
Total	100	9	100	30				

P^α valor do teste Fisher
N (número de pacientes)

Tabela 10 - Comparação do uso de contraceptivo nos grupos de mulheres com endometriose e férteis (Biópsia) e o grupo controle (Cont).

6 DISCUSSÃO

A endometriose afeta cerca de 10% a 15% das mulheres em idade reprodutiva (GIUDICE; KAO, 2004). Costa (2010) em seu trabalho, encontrou idade média de 32,5 anos nas pacientes com endometriose, e de 37,6 anos para o grupo controle. Em nosso estudo encontramos dados aproximados aos de Costa (2010) quanto a idade média das pacientes com endometriose e do grupo controle, que foi de 33,32 anos para as pacientes com a doença, e de 37,93 anos para as pacientes do grupo controle. Contudo, em seu trabalho Sangi-Haghpeykar e Poindexter (1995), evidenciaram que quando comparadas à um grupo de mulheres mais jovens, mulheres com mais de 36 anos têm mais chance de serem acometidas pela endometriose.

Matsuzaka e colaboradores (2012) ao analisar polimorfismos dos genes de desintoxicação de dez dioxinas (*AhR*, *AHRR*, *ARNT*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *NAT2*) através de amostras de sangue em 100 pacientes com endometriose, juntamente com 143 compondo o grupo controle, encontraram uma frequência menor do *GSTM1* nulo para as pacientes com endometriose, se comparado com o grupo controle; tendo como resultados a frequência de 43% do *GSTM1* nulo para as pacientes com endometriose; e para o grupo controle foi encontrado uma frequência de 67% para *GSTM1* nulo; e assim concluíram que os polimorfismos dos genes de desintoxicação das dez dioxinas (incluindo o *GSTM1*) não contribuem para a etiologia da endometriose entre os indivíduos por eles estudados.

Em seu trabalho, Trabert e colaboradores (2011) encontraram alguns dados semelhantes aos de Matsuzaka e colaboradores (2012), ao avaliar a relação entre a variação genética comum em genes envolvidos na biossíntese e sinalização de estrogênio e progesterona e o risco de endometriose (a partir de amostras de sangue e saliva) em 313 pacientes com endometriose e 727 compondo o grupo controle, eles não encontraram evidências de associações consistentes significativas entre os genes: *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *HSD17B1*, *HSD17B2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *COMT* e *GSTM1*), que são candidatos previamente relatados em genes relacionados com o hormônio do sexo e risco de endometriose. Em nosso estudo encontramos dados semelhantes aos de Trabert e colaboradores (2011) e Matsuzaka e colaboradores (2012), ao compararmos as amostras de

biópsias de pacientes com endometriose (n=49) e grupo controle (n=44), que foram avaliadas segundo a presença e ausência do gene *GSTM1*; constatamos que a frequência do gene *GSTM1* nulo no grupo endometriose (biópsia, 55%) foi 25% menor se comparado com o grupo controle (75%), sendo esta diferença não estatisticamente significante, $p=0,07$. A partir desses dados, infere-se que possivelmente, o *GSTM1* nulo pode não estar relacionado com a proliferação celular da endometriose nas pacientes consideradas em nosso estudo.

No entanto Jun e colaboradores (2003), a partir de amostras de sangue, encontraram frequência significativa do gene *GSTM1* nulo 72,1% (49/68), nas pacientes com endometriose (68 mulheres), quando comparado com o grupo controle (28 mulheres) que apresentou 42,9% (12/28) *GSTM1* nulo. Contudo a sequência do gene *GSTM1* estudada por eles diferiu da sequência analisada no presente trabalho. Huang *et al.* (2010) em seu estudo com mulheres taiwanesas encontraram assim como Jun e colaboradores (2003), uma frequência maior do *GSTM1* nulo no grupo com endometriose em comparação ao grupo controle. A partir de amostras de sangue, a frequência encontrada, do *GSTM1* nulo foi 42,9% (12/28), nas pacientes com endometriose (28 mulheres), e ao ser comparado com o grupo controle (29 mulheres), apresentou uma frequência do *GSTM1* nulo de 34,5% (10/29). Santos e colaboradores (2011), ao trabalharem com polimorfismos nos genes *MMP2*, *MMP13*, *CYP1A1*, *GSTM1* e *EMX2* associados à endometriose, chegaram a conclusão que os polimorfismos genéticos estudados por eles parecem ter influência na etiologia da doença, e que variações no gene *GSTM1* expõe as células a maior toxicidade, por não exercerem sua função corretamente. Os resultados encontrados por esses autores são distintos dos resultados obtidos em nosso estudo, já que a frequência que encontramos do gene *GSTM1* nulo no grupo endometriose foi significativamente menor quando comparado com o grupo controle, implicando que, possivelmente, o *GSTM1* não contribui para a etiologia da endometriose.

Silva (2012), avaliou a correlação entre a endometriose e os polimorfismos dos genes *CYP1A1* e *TP53* em 63 mulheres, sendo 21 mulheres diagnosticadas com endometriose (PCR foi feita a partir de amostras biópsia), e 42 mulheres formavam o grupo controle (PCR foi realizada a partir de amostras de sangue). Esse autor não encontrou significância estatística quanto à variação genotípica do *TP53* entre as amostras de sangue e o biópsia nas pacientes com endometriose. Em nosso estudo comparamos a frequência do *GSTM1* segundo a presença e ausência do mesmo no grupo diagnosticado com endometriose, a partir de amostras de biópsia com a frequência obtida a partir de amostras de sangue do trabalho de Frare, (2011);

que analisou as mesmas pacientes do grupo com endometriose considerado nesse estudo. A presença do *GSTM1* encontrada foi de 45% (22/49) no grupo de mulheres com endometriose (biópsia), com ausência do mesmo em 55% (27/49). No grupo com endometriose (sangue), a presença do *GSTM1* teve frequência de 49% (24/49), com ausência do mesmo de 51% (25/49). Verificou-se que a frequência do gene *GSTM1* no grupo com endometriose (biópsia) foi 4% menor se comparado ao grupo com endometriose (sangue), sendo esta diferença não estatisticamente significativa. Infere-se desses resultados que, possivelmente, não há diferença na frequência do *GSTM1* em amostras obtidas de tecidos diferentes das pacientes com endometriose que participaram desse trabalho. Na literatura, há escassez de estudos que comparam a frequência do polimorfismo do *GSTM1*, a partir de amostras de biópsia e sangue; o resultado alcançado por Silva (2012), apesar de ter sido obtido a partir da análise de um gene distinto do *GSTM1*, também não encontrou uma variação genotípica do gene em questão (*TP53*) entre as amostras de sangue e o biópsia nas pacientes com endometriose.

Gattas e Soares-Vireira (2000), investigaram mutações nos genes *GSTM1* e *CYP2E1* em indivíduos saudáveis de São Paulo, Brasil, que incluiu 206 brancos e 86 mulatos. A frequência do *GSTM1* nulo foi significativamente maior nos indivíduos brancos (60,2%) do que em mulatos (41,9%). Chen e colaboradores (1996) analisaram 416 pacientes saudáveis quanto as frequências do genótipo nulo do *GSTM1* e *GSTT1*. A frequência do *GSTM1* nulo foi maior nos indivíduos brancos (53,5%) do que nos negros (27,6%). Gattas e colaboradores (2004), encontraram resultados semelhantes aos de Gattas e Soares-Vireira (2000), e Chen e colaboradores (1996), ao avaliarem a distribuição do *GSTM1* e *GSTT1* em 594 indivíduos saudáveis em São Paulo, Brasil; sendo 233 brancos, 87 mulatos e 137 negros, encontraram uma maior distribuição do *GSTM1* nulo entre indivíduos brancos (55,4%) do que entre os pardos (41,4%) e negros (32,8%). Ao analisarmos a variável etnia em nosso estudo, com o polimorfismo do *GSTM1* no grupo com endometriose e controle, encontramos dados semelhantes aos dos autores anteriormente descritos, visto que a frequência do *GSTM1* nulo foi também maior no grupo de mulheres que se classificaram como brancas (57%).

Em seu estudo, Kubiszeski (2013), analisou as frequências dos polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* em 218 mulheres em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. A frequência encontrada no grupo com endometriose foi maior em mulheres pardas 49,6% (60/121), do que em brancas 40,5% (49/121) e 7,4% (9/121) negras. No entanto, Chatman (1976), encontrou resultados diferentes de Kubiszeski (2013), pois em seu trabalho encontrou a prevalência da

endometriose em mulheres negras. Os resultados encontrados por Kubischeski (2013) e Chatman (1976), foram diferentes dos resultados do nosso estudo. Desta maneira, possivelmente, é incerta a participação da raça como fator de risco para a endometriose, visto que populações distintas podem ter diferentes contribuições para uma doença genética, e padrões genéticos podem variar entre populações étnicas (RAHMIOGLU *et al.*, 2012)

Vercellini e colaboradores, (2010) realizaram uma meta-análise restrita a artigos de pesquisa publicados que compararam a exposição aos contraceptivos orais (CO) em mulheres com endometriose diagnosticadas cirurgicamente com mulheres sem essa patologia, sobre a relação entre a exposição de CO e risco de endometriose; chegando a conclusão de que o risco de endometriose é reduzido durante o uso CO. No entanto, Silva (2012), em seu estudo não encontrou relação significativa entre o uso de contraceptivo e o polimorfismo do gene *CYP11A1* nas pacientes com endometriose. Costa (2010), também não encontrou diferença significativa nas pacientes com endometriose quanto ao uso de contraceptivo, ao analisar o gene *PROGINS*. Assim, como Costa (2010) e Silva (2012), em nosso estudo não encontramos relação significativa entre o uso de contraceptivo e o polimorfismo do gene especificadamente analisado em cada respectivo trabalho; em nosso caso não encontramos relação significativa entre o uso de contraceptivo e o polimorfismo no gene *GSTM1*.

Estudos de genes candidatos têm limitações, como por exemplo, amostras de pequenas dimensões, apenas um ou alguns genes de uma via biológica relevante são tipicamente testados (ZONDERVAN; CARDON; KENNEDY, 2002). Desta maneira, não podemos assegurar que o *GSTM1* de modo isolado, pode ser utilizado para o diagnóstico da endometriose. Outros genes candidatos, responsáveis pelas fases I e II de desintoxicação já foram relatados em vários estudos publicados (BABU, et al, 2004; BOZDAG et al, 2010; ERTUNC, et al, 2005; MATSUZAKA et al, 2012). No entanto, até o momento os estudos de genes candidatos não forneceram fortes evidências, no que se condiz com variantes genéticas associadas com endometriose. Historicamente, a busca de genes que contribuem para a suscetibilidade de doenças complexas, como a endometriose, começou com estudos-dirigidos com a hipótese de "associação de genes candidatos" (CGASs). E para testar completamente o envolvimento de um gene em uma via biológica, é necessário investigar todos os genes que compõem a via (bem como os fatores que regulam a sua expressão), em uma grande amostra de casos e controles; um procedimento que seria extremamente caro, e que ainda não foi financiado (RAHMIOGLU *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÃO

Encontramos uma diferença significativa quanto a idade média das pacientes com endometriose (33,32 anos) e do grupo controle (37,93 anos). Verificamos que a frequência do gene *GSTM1* nulo no grupo endometriose (biópsia, 55%) foi 25% menor se comparado com o grupo controle (75%), sendo esta diferença não estatisticamente significativa, com base nesses resultados infere-se que possivelmente, *GSTM1* nulo pode não estar relacionado com a proliferação celular da endometriose.

Também constatamos que a frequência do gene *GSTM1* no grupo com endometriose (biópsia) foi 4% menor se comparado ao grupo com endometriose (sangue), não sendo esta diferença estatisticamente significativa; indicando que possivelmente, a frequência do *GSTM1* não varia em tecidos diferentes, quando as amostras procedem das mesmas pacientes. Para a confirmação dessa proposição, é necessário que mais estudos sejam realizados em outras populações, com um número maior de amostras, em que se realize a associação do *GSTM1* com outros genes candidatos pertencentes a sua via biológica.

Em relação à etnia, verificamos que a frequência do *GSTM1* nulo foi maior no grupo de mulheres que se classificaram como brancas; e quanto o uso de contraceptivo, não encontramos relação significativa entre o polimorfismo no gene *GSTM1* e o uso do mesmo.

8 GLOSSÁRIO

A

Adenomiiose – patologia uterina caracterizada pela presença de glândulas e estroma endometrial dentro do útero.

Álgica – que provoca a dor.

Anamnesia – consiste na história clínica do paciente, ou seja, é o conjunto de informações obtidas pelo médico por meio de entrevista previamente esquematizada.

D

Dioxinas – substâncias químicas liberadas como subproduto industrial e que podem causar vários malefícios para o organismo humano.

Dismenorreia – cólica menstrual.

Dispareunia – dor intensa durante e após o ato sexual.

E

Endométrio – tecido que reveste a cavidade uterina.

M

Menarca – Primeira menstruação

P

Polimorfismo (genético) – Coexistência de alelos múltiplos em um *locus*.

9 REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. S.; MELO, P. V. O que é Endometriose. In: Mendonça, E. et al. Um Enigma Chamado Endometriose. Belo Horizonte: **Health**, p. 47-54, 1998.

ABRÃO, M. S.; NEME, R. M.; AVERBACH, M. Endometriose de septo retovaginal: Doença de diagnóstico e tratamento específicos. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 40, n. 3, set., 2003.

ABRÃO, M. S.; PODGAEC, S; DIAS JR. J. A. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. **Prática hospitalar**, v. 50, p. 73-74, 2007.

AGARWAL, N.; SUBRAMANIAN, A. Endometriosis: morphology, clinical presentations and molecular pathology. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 2, n. 1, p. 1-9, jan./jun. 2010.

ASRM (Practice committee of the American Society for Reproductive Medicine) et al. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, vol. 99, n. 1 p.44-46, jan., 2013.

BABU, K. A. et al. N-acetyl transferase 2 polymorphism and advanced stages of endometriosis in South Indian women. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 9, n. 5, p. 533-40, 2004.

BARANOVA, H. et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to Endometriosis in a French population. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 9, p. 775-780, 1997.

BENAGIANO, I. B. G. Endometriosis, a modern syndrome. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 6, p. 581-593, jun., 2011.

BISCHOFF, F.; SIMPSON, J. L. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 1, p. 37-44, 2000.

BISCHOFF, F; SIMPSON, J. L. Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 224, abr., 2004.

BOZDAG, G. et al. CYP17 and CYP2C19 gene polymorphisms in patients with endometriosis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 20, p. 286-90, 2010.

BRICOU, A.; BATT, R. E., CHAPRON C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.138, n. 2, p.127-34, 2008.

BROSENS, I. et al. Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, p. 285-303, 2004.

BULUN, S. E.; Endometriosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 3, p.268-79. rev., 2009.

CARDOSO, M. M. et al. Avaliação da concordância entre a ultrassonografia transvaginal e a ressonância magnética da pelve na endometriose profunda, com ênfase para o comprometimento intestinal. **Radiologia Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 89–95, mar./abr., 2009.

CHAMIÉ, L. P. **Endometriose pélvica**: aspectos à ressonância magnética e correlação com laparoscopia e anatomia patológica. 2008. Tese (Doutorado em medicina). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

CHEN, C. L.; LIU, Q.; RELLING, M. V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics**, v. 6, n. 2, p.187-91, abr., 1996.

CHATMAN, D. L. Endometriosis in the black woman. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 125, n. 7, p. 987-9, aug., 1976.

COSTA, I. R. **Análise do polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com endometriose**. 2010. Tese. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2010.

D'HOODGE, T. M. et al. Endometriosis and subfertility: Is the relationship resolved?. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 21, p. 243-254, 2003.

ERTUNC, D. et al. Glutathione-S-transferase P1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis. **Human Reproduction**. v. 20, n. 8, p. 2157-61, 2005.

FRARE, Ariane Bocaletto. **Investigação dos polimorfismos GSTMI e GSTTI em mulheres com endometrioses**. 2011. Tese. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2011.

FRASER, I. S. Recognising, understanding and managing endometriosis. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 1, n. 2, p. 56–64, jul./dez., 2008.

GATTAS, G. J. F. et al . Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto , v. 37, n. 4, abr., 2004.

GATTAS, G. J. F.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and Mulattoes from Brazil. **Occupational Medicine**, v. 50, p. 508–511, 2000.

GEMMILL, J. A. L., et al. Cancers, infections, and endocrine disorders in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 5, p. 1627-1631, oct., 2010.

GIORDANO, M. G. **Ginecologia Endócrina e da Reprodução**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, p. 225,1998.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, p. 1789-99, 2004.

GONG, M. et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 with prostate cancer risk: A Meta-analysis of 57 studies. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 50-87, 2012.

GUTHENBERG, C. et al. Two distinct forms of glutathione transferase from human fetal liver: purification and comparison with isoenzymes isolated from adult liver and placenta. **Biochemical Journal**, v. 235, n. 3, p. 741-745, 1986.

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

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J.; The glutathione S transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 445-600, 1995.

HONG, Y. C. et al. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. **Toxicology Letters**, v. 129, p. 255-62, 2002.

HUANG, P. C. et al. Association between phthalate exposure and glutathione S-transferase M1 polymorphism in adenomyosis, leiomyoma and endometriosis. **Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 986-994, apr., 2010.

HUGHESDON, P. E. The structure of endometrial ovarian cysts. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology of the British Empire**, v. 64, p. 481-487, 1957.

JACKSON, B.; TELNER, D. E. Managing the misplaced approach to endometriosis. **Canadian Family Physician**, v. 52, n. 11, p. 1420-1424, nov., 2006.

JANSEN, R. P.; RUSSELL, P. Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 155, n. 6, p. 1154-1159, 1986.

JUN, L. et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and endometriosis risk: a case-controlled study. **Chinese Medical Journal**, v. 116, n. 5, p. 777-780, 2003.

KUBISZESKI, E. H. **Avaliação de polimorfismos nos genes GSTM1 e GSTT1 e a associação com endometriose em mulheres de Mato Grosso – Brasil**. Tese. (Doutorado em medicina) Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2013.

LECKE, S. B. **Expressão gênica de bcl2, receptor de estradiol e receptores de progesterona A e B em endométrio eutópico e ectópico de pacientes inférteis sem e com endometriose**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LINHARES, J. J. et al. Polimorfismo do gene receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama: estudo caso-controle. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, 2005.

MACER, M. L.; TAYLOR, H. S. Endometriosis and Infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics & Gynecology Clinics of North America**, v. 39, n. 4, p. 535-549, dec., 2012.

MACHADO, T. M. et al. Endometriose vesical: aspectos, diagnósticos e terapêuticos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, mar., 2001.

MANGTANI, P.; BOOTH, M.; Epidemiology of endometriosis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 47, p. 84-88, 1993.

MATSUZAKA, Y. et al. Lack of an association human dioxin detoxification gene polymorphisms with endometriosis in Japanese women: results of a pilot study. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 17, n. 6, p. 512–517, nov., 2012.

MUNKSGAARD, P. S.; BLAAKAER, J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. **Gynecologic Oncology**, v. 124, p. 164–169, 2012.

NAKATA, L. C. et al. Biomarcadores de Suscetibilidade à Endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 4, 2004.

NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertility and Sterility**, v.68, p.585-96, 1997.

NOMINATO, N. S. et al. Endometriose de cicatriz cirúrgica: estudo retrospectivo de 72 casos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 8, p.403-407, 2007.

OICIOSO, J. R.; GONZALEZ, F. J. Metabolomics. **Cell Metabolism**, v. 6, p. 348-351, 2007.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, v. 221, n. 2, p. 123-129, 2005.

PODGAEC, S et. al. Endometriose: uma doença inflamatória com um componente de resposta imune Th2. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1373-1379, 2007.

RAHMIOGLU, N.; MISSMER, S. A.; MONTGOMERY, G. W.; ZONDERVAN, K. T. Insights into Assessing the Genetics of Endometriosis. **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, v.1, n. 3, p. 124-137, 2012.

REBBECK, T. R. Molecular epidemiology of human glutathione S transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 6, p. 733- 43, 1997.

REINA, L. C. B. et al . Interação de compostos organossulfurados derivados do alho com o citocromo-c: um estudo eletroquímico. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, 2002.

ROHR, P. et al. Análise dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em pacientes que desenvolveram leucemias agudas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 2 n. 3/4, p. 145, jul./dez., 2004.

ROSSI, A; CONFORTI, F. N. D. T. Susceptibilidade genética, biometabolismo e câncer. **Revista SBC**, v. 3, p. 26-30, 2000.

SAGAE, U. E. **Endometriose do trato gastrointestinal: correlações clínicas e laparoscópicas; papel da corrida dos órgãos peritoneais na endometriose.** Tese. (Doutorado em medicina) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SANGI-HAGHPEYKAR, H.; POINDEXTER, A. N. Epidemiology of endometriosis among parous women. **Obstetrics & Gynecology**, v. 85, p. 983-992, 1995.

SANTOS, R. P. et al. Polimorfismos nos genes MMP2, MMP13, CYP1A1, GSTM1 e EMX2 e endometriose. **Femina**, v. 39, n. 6, p. 313-317, jun., 2011.

SAMPSON, J. A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. **American Journal of Pathology**, v. 3, n. 2, p. 93–110, 1927.

SAMPSON, J. A. Perforating hemorrhagic cysts of the ovary, their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type. **Archives of Surgery**, v.3, n.2, p. 245-7, 1921.

SILVA, A. M. M. **Análise do polimorfismo dos genes TP53 e CYP1A1m1 em biópsia de endométrio de pacientes com endometriose.** Tese. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2012.

STILLEY, J. A. W; BIRT, J. A; TIMMS, K. L. S. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 849–862, set., 2012.

TEMPFER, C. B.; SIMONI, M.; DESTENAVES, B.; FAUSER, B. C. J. M. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II—endometriosis. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 1, p. 97–118, jan./feb., 2009.

TRABERT, B. et al. Genetic variation in the sex hormone metabolic pathway and endometriosis risk: an evaluation of candidate genes. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 6, p. 1401–1406, dez., 2011.

VERCELLINI, P. et al. Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 159-170, 2010.

XIAO, W.; AWADALLAH, A.; XIN, W. Loss of ARID1A/BAF250: a expression in ovarian endometriosis and clear cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 7, p. 642-650, 2012.

ZONDERVAN, K. T; CARDON, L. R.; KENNEDY, S. H. What makes a good case-control study? Design issues for complex traits such as endometriosis. **Human Reproduction**. v.17, p.1415–1423, 2002.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO

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 B – TERMO DE CONSENTIMENTO

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: ____/____/____