



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Jéssica Vilarinho Cardoso

**Influência de polimorfismos em genes envolvidos com a suscetibilidade da
endometriose: via dos hormônios sexuais femininos**

Rio de Janeiro

2020

Jéssica Vilarinho Cardoso

**Influência de polimorfismos em genes envolvidos com a suscetibilidade da
endometriose: via dos hormônios sexuais femininos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Jamila Alessandra Perini Machado

Coorientador: Prof^º. Dr^º Daniel Escorsim Machado

Coorientador: Prof^º. Dr^º Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

C268i Cardoso, Jéssica Vilarinho.
Influência de polimorfismos em genes envolvidos com a suscetibilidade da endometriose: via dos hormônios sexuais femininos / Jéssica Vilarinho Cardoso. — 2020.
179 f. : il. color. ; tab.

Orientadora: Jamila Alessandra Perini Machado.
Coorientadores: Daniel Escorsim Machado e Rui Manuel de Medeiros Melo Silva.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2020.

1. Endometriose - diagnóstico. 2. Endometriose - epidemiologia. 3. Endometriose – terapia. 4. Estrogênios. 5. Polimorfismo Genético. 6. Fatores de Risco. I. Título.

CDD – 23.ed. – 618.1

Jéssica Vilarinho Cardoso

Influência de polimorfismos em genes envolvidos com a suscetibilidade da endometriose: via dos hormônios sexuais femininos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 27/03/2020

Banca Examinadora

Prof^a Dr(a). Rômulo Medina de Mattos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^o Dr. Plínio Tostes Berardo
Hospital Federal dos Servidores do Estado

Prof^a Dr(a). Nathalia de Oliveira Meireles da Costa
Instituto Nacional do Câncer

Prof^a Dr(a). Rita de Cássia Elias Estrela Marins
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^a Dr(a). Jamila Alessandra Perini Machado (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao único que é digno de ser adorado, o meu Senhor Jesus, por sempre ser minha base, proteção, força e meu guia. Sem Ele nada do que construir na vida seria possível, inclusive finalizar esse curso.

Agradeço também a Deus por ter me dado uma família incrível, em especial, por ter me proporcionado ser filha de uma mãe amável, companheira, guerreira e que me apoia em tudo. Obrigada mãe por ser minha melhor amiga.

Outro agradecimento especial é para os meus maravilhosos amigos de trabalho. Passamos por muitas coisas, mas em tudo tivemos o apoio um dos outros. E nada nessa vida é construído sozinho. Graças a Deus, tive a imensa benção de ter bons amigos do meu lado.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Daniel Machado por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos. Muito obrigada por toda ajuda, ensinamentos e dedicação. Levo para minha vida um grande exemplo de professor.

Além disso, agradeço ao meu coorientador Dr. Rui Medeiros que me proporcionou a oportunidade de fazer um intercâmbio em seu laboratório. Foi uma experiência única e esplêndida. Pude adquirir um grande enriquecimento para minha formação profissional e pessoal.

Gostaria também de agradecer aos Drs. Plínio Tostes, Renato Ferrari e Maurício Abrão por toda colaboração e por terem acreditado nesse projeto.

Por fim, quero agradecer a minha querida orientadora Prof^a Jamila Perini por esses 8 anos de muita dedicação, carinho, aprendizado e amizade. Aprendi muito ao longo desses anos e devo tudo isso a você. Tenho muita admiração e respeito pela mulher e profissional que és. Sempre muito cuidadosa e preocupada com meu bem-estar. Agradeço pela confiança de poder desenvolver esse incrível projeto. Foi uma grande honra para mim. Muito obrigada por tudo.

No mais, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa tese, inclusive as pacientes que participaram voluntariamente para o andamento do projeto.

RESUMO

A endometriose é uma doença crônica, influenciada por fatores ambientais, hormonais e genéticos. Por ser dependente de estrogênio, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes envolvidos nessa via poderiam promover alterações funcionais em suas proteínas, influenciando no desenvolvimento da endometriose. Assim, o objetivo desta tese foi investigar a influência dos SNPs do receptor da progesterona (*PGR*)+331C>T, do citocromo P450 (*CYP*) 17A1 -34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2 e *17, e da metaloproteinase de matriz (*MMP*)-3 276A>G na suscetibilidade da endometriose, bem como avaliar o perfil epidemiológico das mulheres com esta doença. Para alcançar os objetivos propostos foram realizados cinco artigos. O 1º artigo foi um estudo descritivo das características epidemiológicas de mulheres com endometriose recrutadas no período de 2011 à 2018. O 2º, 3º e 4º artigos foram do tipo caso-controle e avaliaram a magnitude de associação dos SNPs selecionados com o desenvolvimento da endometriose, sendo utilizado uma regressão logística para as análises. Por fim, foi realizado uma revisão sistemática dos estudos de associação ampla do genoma (GWA) na endometriose. A dismenorreia (OR = 2,22 e IC 95% = 1,18-4,42) e dor pélvica (OR = 1,79 e IC 95% = 1,07-3,01) foram associadas com o ciclo menstrual irregular. A dispareunia foi associada com IMC >25kg/m² (OR = 1,97 e IC 95% = 1,10-3,53), consumo de álcool (OR = 2,13; IC 95% 1,20-3,82) e endometriose superficial (OR = 0,25 e IC95% = 0,11-0,57). Endometriose profunda infiltrativa (EPI) e estágio III-IV foram associados com alterações intestinais (OR = 2,58; 95% IC = 1,08–6,11 e OR = 2,75; 95% IC = 1,31-5,76). Mulheres entre 30-39 anos apresentaram maior probabilidade de serem inférteis do que aquelas com <29 anos (OR = 2,72 e IC 95% = 1,02-7,24). O genótipo combinado dos SNPs *PGR*+331C>T, *CYP17A1*-34A>G e *CYP19A1* 1531G>A foram associados positivamente com a endometriose (OR = 1,72 e IC 95% = 1,09-2,72). O SNP *CYP2C19**2 foi positivamente associado com a endometriose (OR = 1,83 e IC 95% = 1,17-2,85) e a obesidade relacionada à doença (OR = 3,27 e IC 95% = 1,55-6,89). Já o SNP *MMP*-3 276G>A foi associado com os casos de EPI (OR = 1,87 e IC 95% = 1,01-3,45) e a infertilidade (OR = 3,30 e IC 95% = 1,31-8,33). A revisão sistemática identificou as variantes *WNT4* rs7521902, *GREB1* rs13394619, *FNI* rs1250248, *IL1A* rs6542095 e *VEZT* rs10859871 significativamente associadas com a suscetibilidade da endometriose. Os dados da presente tese podem contribuir para um melhor entendimento da etiopatogenia da doença, na otimização do diagnóstico e orientar o tratamento clínico da endometriose.

Palavras-chave: Diagnóstico, Endometriose, Estrogênio, Epidemiologia, Polimorfismo.

ABSTRACT

Endometriosis is a chronic disease, influenced by environmental, hormonal and genetic factors. As it is estrogen dependent, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in this pathway could promote functional changes in its proteins, influencing the development of endometriosis. Thus, the objective of this thesis was to investigate the influence of the progesterone receptor (*PGR*) + 331C>T, cytochrome P450 (*CYP*) 17A1 - 34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2 and *17, and matrix metalloproteinase (*MMP*)-3 276A>G in the susceptibility to endometriosis, as well as to evaluate the epidemiological profile of women with this disease. To achieve the proposed objectives, five articles were elaborated. The 1st article was a descriptive study of the epidemiological characteristics of women with endometriosis recruited from 2011 to 2018. The 2nd, 3rd and 4th articles were case-control and evaluated the magnitude of association of the selected SNPs with the development of endometriosis, using logistic regression for the analyzes. Finally, a systematic review of genome-wide association (GWA) studies in endometriosis was performed. Dysmenorrhea (OR = 2.22 and 95% CI = 1.18-4.42) and pelvic pain (OR = 1.79 and 95% CI = 1.07-3.01) were associated with the irregular menstrual cycle. Dyspareunia was associated with a BMI >25kg/m² (OR = 1.97 and 95% CI = 1.10-3.53), alcohol consumption (OR = 2.13; 95% CI 1.20-3.82) and superficial endometriosis (OR = 0.25 and 95% CI = 0.11-0.57). Deep infiltrative endometriosis (DIE) and stage III-IV were associated with intestinal changes (OR = 2.58; 95% CI = 1.08–6.11 and OR = 2.75; 95% CI = 1.31-5, 76). Women aged 30-39 years were more likely to be infertile than those aged <29 years (OR = 2.72 and 95% CI = 1.02-7.24). The combined genotype of the SNPs *PGR* +331C>T, *CYP17A1*-34A>G and *CYP19A1* 1531G>A were positively associated with endometriosis (OR = 1.72 and 95% CI = 1.09-2.72). SNP *CYP2C19**2 was positively associated with endometriosis (OR = 1.83 and 95% CI = 1.17-2.85) and disease-related obesity (OR = 3.27 and 95% CI = 1.55 -6.89). The SNP *MMP*-3 276G>A was associated with cases of DIE (OR = 1.87 and 95% CI = 1.01-3.45) and infertility (OR = 3.30 and 95% CI = 1, 31-8.33). The systematic review identified the *WNT4* rs7521902, *GREB1* rs13394619, *FNI* rs1250248, *IL1A* rs6542095 and *VEZT* rs10859871 variants significantly associated with the susceptibility to endometriosis. The data from the present thesis may contribute to a better understanding of the disease's etiopathogenesis, in the optimization of the diagnosis and guide the clinical treatment of endometriosis.

Keywords: Diagnosis, Endometriosis, Estrogen, Epidemiology, Polimorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Locais mais comuns de implantação de lesões endometrióticas...	17
Figura 2 -	Prevalência e sobreposição de sintomas de dores ginecológicas que levaram ao diagnóstico cirúrgico de 940 mulheres com endometriose que participaram do estudo OXEGENE.....	19
Figura 3 -	Regulação da angiogênese do tecido adiposo por múltiplos fatores.....	24
Figura 4 -	Teoria da menstruação retrógrada.....	31
Figura 5 -	Esquema das alterações no endométrio humano durante o ciclo menstrual, ilustrando o crescimento, diferenciação e degradação das camadas funcionais.....	33
Figura 6 -	Representação esquemática da biossíntese e metabolismo do estrogênio.....	35
Figura 7 -	Estrutura do gene <i>CYP17A1</i> e localização do SNP -34 A>G (rs743572).....	38
Figura 8 -	Estrutura do gene <i>CYP19A1</i> e localização do SNP 1531G>A (rs10046).....	38
Figura 9 -	Estrutura do gene <i>CYP2C19</i> e localização dos SNPs *2 (rs4244285) e *17 (rs12248560).....	39
Figura 10 -	Isoformas do receptor da progesterona produzidos pelo gene <i>PGR</i>	40
Figura 11 -	Estrutura do gene <i>PGR</i> e localização do SNP +331C>T (rs10895068).....	40
Figura 12 -	Estrutura do gene <i>MMP-3</i> e localização do SNP 276A>G (rs679620).....	41
Artigo 1, Figure 1 -	Frequency of the individual and concomitant endometriosis classifications in the study population.....	70
Artigo 1, Figure 2 -	Frequency of the individual and concomitant symptoms in the study population. About 8.9% of endometriosis patients hadn't any gynecologic pain symptoms.....	72
Artigo 1, Figure 3 -	Comparison between asymptomatic and symptomatic women for dysmenorrhea (A-B), non-cyclic chronic pelvic pain (C),	76

	deep dyspareunia (D-F), cyclical intestinal complaints (G-J) and infertility (K-L), regarding the demographic, clinical and menstrual characteristics of the study population.....	
Artigo 2, Fig. 1 -	Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms <i>PGR</i> +331 C>T, <i>CYP17A1</i> -34 A>G and <i>CYP19A1</i> G>A in the study population.....	82
Artigo 2, Fig. 2 -	Minor allelic frequencies of the polymorphisms studied among symptomatic and asymptomatic endometriosis patients.....	83
Artigo 4, Fig. 1 -	Allelic and genotypic distribution of the <i>MMP3</i> 276 G>A polymorphism in the endometriosis cases and control group.....	95
Artigo 4, Fig. 2 -	Allelic and genotypic distribution of the <i>MMP3</i> 276 G>A polymorphism in fertile and infertile women with endometriosis.....	96
Artigo 5, Figure 1 -	Flow chart of GWA studies included in this systematic review.....	124
Artigo 5, Figure 2 -	Molecular pathways and SNPs associated with endometriosis susceptibility.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de associação dos SNPs <i>PGR</i> +331C>T, <i>CYP17A1</i> -34A>G, <i>CYP19A1</i> 1531G>A, <i>CYP2C19*2</i> e <i>CYP2C19*17</i> com a endometriose em diferentes populações.....	44
Tabela 2 -	Características dos SNPs estudados e das sondas utilizadas para cada análise.....	49
Artigo 1, Table 1 -	Sociodemographic characteristics of the study population (N = 237).....	71
Artigo 1, Table 2 -	Clinical characteristics of the study population (N = 237).....	73
Artigo 1, Table 3 -	Distribution of demographics and clinical characteristics in subgroups of patients with endometriosis (diagnosis and classification).....	74
Artigo 2, Table 1 -	Demographic and clinical characteristics of the study population (N = 340).....	81
Artigo 2, Table 2 -	Combined genotype frequencies of the polymorphisms <i>PGR</i> +331 C>T, <i>CYP17</i> -34 A>G and <i>CYP19</i> 1531 G>A between controls and cases, and their association with the risk of endometriosis.....	84
Artigo 2, Table 3 -	Frequency of the studied polymorphisms among different populations (endometriosis patients and controls).....	84
Artigo 3, Table 1 -	Association analysis of the <i>CYP2C19*2</i> and <i>CYP2C19*17</i> polymorphisms between control and cases (all endometriosis patients or DIE cases).....	90
Artigo 4, Table 1 -	Association analyses of the <i>MMP3</i> 276 G>A polymorphism with endometriosis risk.	96
Artigo 5, Table 1 -	Baseline characteristics of GWA studies included in this systematic review.....	125
Artigo 5, Table 2 -	Diagnosis/selection characteristics of the GWA case-control studies included in this systematic review.....	128
Artigo 5, Table 3 -	Characteristics of the most frequently investigated polymorphisms in the GWA studies.....	129
Artigo 5, Table 4 -	Summary of the minor allelic frequency data and of the	131

association results of GWA studies included in this systematic
review.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Microlitro
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i> (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
CA125	<i>Cancer antigen 125</i>
CDKN2B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B</i> (Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 2B)
CDS	<i>Coding sequence</i> (Região Codificante)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cm	Centímetro
CO	Contraceptivo Oral
CYP17A1	Citocromo P450 Família 17 Subfamília A Membro 1
CYP19A1	Citocromo P450 Família 19 Subfamília A Membro 1
CYP2C19	Citocromo P450 Família 2 Subfamília C Membro 19
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor 4 de quimiocina CXC)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i> (Molécula de adesão celular epitelial)
EPI	Endometriose profunda infiltrativa
ER	<i>Estrogen receptor</i> (Receptor do estrogênio)
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i> (Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia)
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i> (Sociedade Européia de oncologia Médica)
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i> (Fator de crescimento do fibroblasto – 2)
FR- α	<i>Folate receptor - α</i> (Receptor de folato – α)
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (Hormônio liberador de gonadotrofina)

GREB1	<i>Growth Regulating Estrogen Receptor Binding 1</i> (Ligação ao receptor de estrogênio regulador do crescimento 1)
GWA	<i>Genome wide association</i> (Associação do genoma amplo)
H ₂ O q. s. p.	Água quantidade suficiente para
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HFL	Hospital Federal da Lagoa
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado
HIF - 1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> (Fator hipóxia-induzida 1 α)
HMF	Hospital Moncorvo Filho
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> (Equilíbrio de Hardy-Weinberg)
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de massa corporal
kDa	Quilodalton
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i> (Receptor do domínio de inserção da cinase)
Kg	Quilograma
LaPesF	Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas
M ²	Metro elevado ao quadrado
MBV	Membrana Basal Muscular
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMP	metaloproteinase de matriz
MMP- 3	metaloproteinase de matriz - 3
mRNA	Acido Ribonucleico mensageiro
ng	Nanograma
OMA	Endometrioma ovariano
OR	<i>Odds Ration</i> (Razão de Chance)
ORa	<i>Odds Ration adjusted</i> (Razão de Chane ajustada)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

PGR	<i>Progesterone Receptor</i> (Receptor da Progesterona)
PIGF	<i>Placental growth factor</i> (Fator de Crescimento Placentário)
PR-A	<i>Progesterone Receptor A</i> (Isoforma A do Receptor da Progesterona)
PR-B	<i>Progesterone Receptor B</i> (Isoforma B do Receptor da Progesterona)
RBC	<i>Real Biotech Corporation</i>
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Região promotora do gene
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de um único nucleotídeo)
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para Ciências Sociais)
SUP	Endometriose superficial
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> (Inibidores teciduais específicos de MMPs)
UEZO	Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
USTV	Ultrassonografia Transvaginal
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região não traduzida)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento do endotélio vascular)
VEGFR-1, -2 e -3	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular) 1, -2 e -3
VPN	Valor Preditivo Negativo
χ^2	Qui-quadrado de Pearson

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 ENDOMETRIOSE	17
2.1.1 Epidemiologia da endometriose	18
2.1.2 Fatores de risco associados à endometriose	21
2.1.2.1 Índice de massa corporal e o desenvolvimento da endometriose	22
2.1.3 Diagnóstico da endometriose	25
2.1.4 Tratamento da endometriose	29
2.1.5 Etiologia da endometriose	30
2.2 PAPEL FISIOLÓGICO DO ESTROGÊNIO E DA PROGESTERONA NO CICLO MENSTRUAL	32
2.3 ESTROGÊNIO, PROGESTERONA E MMP NA ENDOMETRIOSE	34
2.3.1 Polimorfismos em genes que codificam as enzimas envolvidas na via dos hormônios sexuais femininos	37
2.3.2 Associação dos SNPs dos genes <i>PGR, CYP17A1, CYP19A1, CYP2C19</i> e <i>MMP-3</i> no desenvolvimento da endometriose	43
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 GERAL.....	47
4.2 ESPECÍFICOS	47
5 ASPECTOS METODOLÓGICOS	48
5.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
6 ASPECTOS ÉTICOS	50
7 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	51
7.1 PRIMEIRO ARTIGO DA TESE.....	51
7.2 SEGUNDO ARTIGO DA TESE.....	77
7.3 TERCEIRO ARTIGO DA TESE	87
7.4 QUARTO ARTIGO DA TESE	93
7.5 QUINTO ARTIGO DA TESE	98
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
REFERÊNCIAS	137
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/HFSE	158

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/HMF.....	162
ANEXO C – QUESTIONÁRIO SOCIO-DEMOGRÁFICO E CLÍNICO.....	166
ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HC-FMUSP	176
ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HFSE.....	177
ANEXO F – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HMF	178

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial fora do útero, influenciada por múltiplos fatores hormonais, inflamatórios, ambientais e genéticos (ABRÃO, 2000; GIUDICE e KAO, 2004; BENAGIANO *et al.*, 2014). Afeta aproximadamente 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva (LOUIS *et al.*, 2011; ACIÉN e VELASCO, 2013), podendo manifestar diferentes sintomas, tais como dismenorréia, dor pélvica crônica, dispareunia, alterações intestinais e urinárias cíclicas e infertilidade (FAUCONNIER *et al.*, 2013).

Para o diagnóstico definitivo da endometriose, ainda são necessários métodos invasivos, como a laparoscopia para realização de uma biópsia, seguido da confirmação histológica da doença. O tratamento farmacológico da doença consiste no alívio dos sintomas, já que o arsenal medicamentoso existente não dispõe de um fármaco capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial, além de acarretar uma série de efeitos adversos à paciente (ABRÃO, 2000; NÁCUL e SPRITZER, 2010). Com isso, para o tratamento definitivo da endometriose também é necessário a realização da laparoscopia, no entanto, mesmo após a cirurgia existe um risco de recorrência em até 5 anos que varia de 12% a 30% das mulheres (VERCELLINI *et al.* 2009; COCCIA *et al.*, 2011; TANDOI *et al.*, 2011). Como são frequentes as falhas e os atrasos no diagnóstico, além das recidivas e dos sintomas serem muitas vezes incapacitantes, as pacientes com endometriose apresentam um desgaste físico e mental, comprometendo sua qualidade de vida e seu bem-estar pessoal e social (BALLARD *et al.*, 2006; SELÇUK e BOZDAĞ, 2013), tornando-se um problema de saúde pública relevante.

A endometriose é considerada uma doença dependente de estrogênio, afeta as mulheres na idade reprodutiva e, em muitos casos, as lesões regredirem após a realização de cirurgia para retirada dos ovários ou até mesmo após o início da menopausa (FERRERO *et al.*, 2014). Sabe-se que o estrogênio possui a capacidade de induzir a proliferação celular tanto do endométrio eutópico quanto do ectópico (VAN KAAM *et al.*, 2007) e que as mulheres com endometriose têm uma alta produção deste hormônio, reforçando o seu importante papel no desenvolvimento da doença (WANG *et. al.*, 2004; WANG *et. al.*, 2013; YU *et. al.*, 2016). A síntese do estrogênio é realizada pela ação de diversas enzimas, dentre as quais se destacam o citocromo P450 Família 17 Subfamília A Membro 1 (CYP17A1), responsável pelas etapas iniciais, (CHENG *et al.*, 2001) o citocromo P450 Família 19 Subfamília A Membro 1 (CYP19A1), (BELL *et. al.*, 2008) responsável pelas etapas finais, e o citocromo P450 Família

2 Subfamília C Membro 19 (CYP2C19), que contribui para o metabolismo do estradiol e no catabolismo da estrona (DALY, 2015). Por outro lado, a progesterona também desempenha uma função de extrema importância na patogênese da endometriose, já que inibe a proliferação induzida pelo estrogênio, devido a interação com seu receptor PGR (receptor da progesterona), regulando negativamente a proliferação das células endometriais (BRAR *et al.*, 2015; BEDAIWY *et al.*, 2015). Ademais, o estrogênio e a progesterona parecem também regular algumas metaloproteinases de matriz (MMPs), tal como a MMP-3, que participa da degradação da matriz extracelular do endométrio durante o ciclo menstrual (BRUNER-TRAN *et al.*, 2002). Em 2012, Mabrouk e colaboradores, demonstraram que a expressão do mRNA da *MMP-3* é significativamente maior no endométrio de mulheres com endometriose do que nos controles, sugerindo que esta metaloproteinase pode estar influenciando no desenvolvimento dessa doença (MABROUK *et al.*, 2012).

A etiologia da endometriose não está totalmente esclarecida. Todavia, é sabido que fatores ambientais (SUNDQVIST *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2015; RAHMIOGLU *et al.*, 2015) e genéticos podem contribuir para o fenótipo desta doença (SHAH *et al.*, 2013; PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b; SAHA *et al.*, 2017; SHAHBAZI *et al.*, 2016; BACKONJA *et al.*, 2017). Em 2014, foi realizada uma revisão que descreveu possíveis genes candidatos na suscetibilidade da doença, destacando-se os genes envolvidos na síntese e regulação do estrogênio, tais como *CYP19A1*, *CYP17*, *PGR* e *MMP-3* (BARANOV *et al.*, 2015). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) presentes nesses genes podem promover alterações funcionais em suas respectivas proteínas (NAGASE *et al.*, 1990; DE VIVO *et al.*, 2002; GHISARI *et al.*, 2014; DALY, 2015), e assim contribuir para o desenvolvimento da endometriose (HSIEH *et al.*, 2005; HUR *et al.*, 2007; ÇAYAN *et al.*, 2009; BOZDAG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; LAMP *et al.*, 2011; PAINTER *et al.*, 2014).

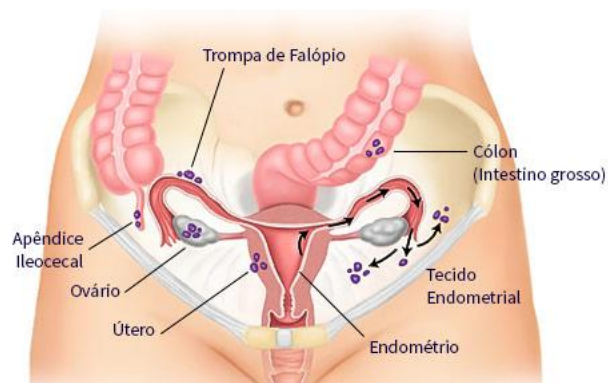
Diante da problemática e do contexto que envolve o desenvolvimento da endometriose, bem como sua relação com os fatores hormonais e genéticos, justifica-se o interesse em estudar SNPs em genes envolvidos na via dos hormônios sexuais femininos em mulheres com endometriose. A partir disso, a presente tese desenvolveu cinco artigos afim de fornecer informações relevantes, tanto em relação ao perfil genético como epidemiológico das mulheres brasileiras com endometriose, para um melhor entendimento da etiologia da doença e para a identificação de fatores de risco associados ao desenvolvimento da endometriose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma doença ginecológica estrogênio dependente definida pela presença de um tecido endometrial fora da cavidade uterina, podendo comprometer vários órgãos, incluindo os ovários, peritônio, ligamentos úteros sacro, septo retovaginal, reto/sigmoide e bexiga (Figura 1). As lesões endometrióticas apresentam glândulas e/ou estromas e são funcionalmente capazes de responder a estímulos hormonais exógenos, endógenos ou locais. (ABRÃO, 2000; GIUDICE e KAO, 2004).

Figura 1 - Locais mais comuns de implantação de lesões endometrióticas



Fonte: Adaptado de The American College of Obstetricians and Gynecologists, 2008.

A endometriose, apesar de ser uma doença benigna, compartilha a fisiopatologia comum a algumas neoplasias malignas, como por exemplo, o câncer de mama, ovário e endometrial, principalmente pelo fato dessas doenças serem dependentes de estrogênio e possuírem uma angiogênese sustentada (NEZHAT *et al.*, 2008; VERIT e YUCEL, 2013; PAVONE e LYTTLE, 2015; FEITELSON *et al.*, 2015). Além disso, há cada vez mais estudos do tipo coorte e caso-controle mostrando que a endometriose pode sofrer transformação de caráter maligno (BORGFELODT e ANDOLF, 2004; MODUGNO *et al.*, 2004; BRINTON *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2007; ARIS, 2010; PEARCE *et al.*, 2012). Em 2017, foi realizada uma revisão a fim de avaliar a associação entre a endometriose e o câncer de ovário, além de outros tipos de câncer. Como conclusão os autores observaram que a endometriose pode ser precursora de carcinomas endometrioides do ovário e de células claras, entretanto, ainda não se sabe a causa desta associação, mas acredita-se que mutações somáticas em genes que

codificam os hormônios sexuais, entre outros, podem desempenhar um papel na progressão da endometriose em câncer de ovário (WILBUR *et al.*, 2017). Outro estudo, realizado por Lu e colaboradores avaliaram um conjunto de dados de endometriose (3.194 casos e 7.060 controles) e câncer de ovário (10.065 casos e 21.663 controles), e observaram que a associação epidemiológica entre a endometriose e o câncer de ovário é pelo menos em parte, atribuível à genética compartilhada (LU *et al.*, 2015).

Diversas questões relacionadas a endometriose ainda permanecem sem resposta, principalmente na identificação de fatores de risco para o desenvolvimento da doença, além de uma melhor caracterização da população acometida.

2.1.1 Epidemiologia da endometriose

A epidemiologia da endometriose apresenta dados conflitantes e inconclusivos, variando à medida que se altera a população estudada, os procedimentos clínicos ou cirúrgicos indicados, o serviço onde se realizam esses procedimentos, entre outros aspectos (MARQUES, 2005).

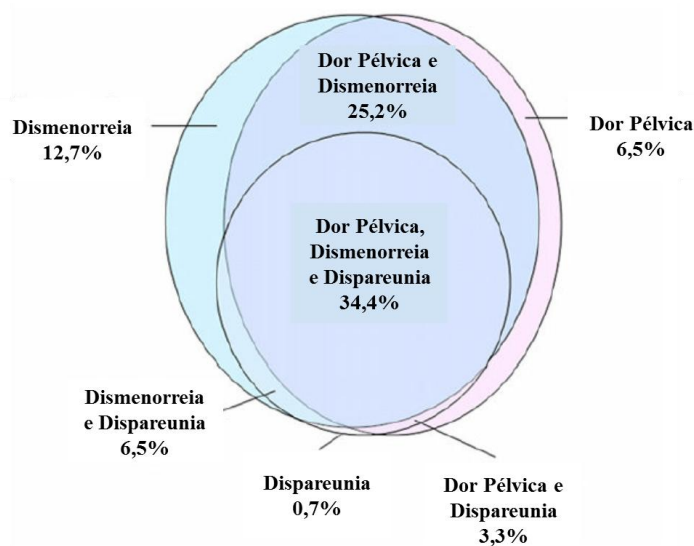
O real perfil da paciente com endometriose é impreciso, principalmente pela variabilidade dos sintomas e a definição diagnóstica, que requer na maioria dos casos abordagem cirúrgica. No entanto, existe um consenso que a endometriose pode afetar cerca de 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva, de 30 a 50% das mulheres inférteis, de 15 a 70% das mulheres com dor crônica e de 3 a 5% das mulheres na pós-menopausa (VIGANO *et al.*, 2004; ACIÉN e VELASCO, 2013; INCEBOZ *et al.*, 2015; SHAFRIR *et al.*, 2018). Nos EUA a prevalência da doença é estimada em sete milhões, e de mais de 70 milhões no mundo inteiro (VERCELLINI *et al.*, 2006).

Recentemente, Ghiasi e colaboradores publicaram uma revisão sistemática sobre a prevalência e incidência da endometriose no mundo nos últimos 30 anos. Dentre os 69 estudos incluídos na revisão, 26 deles envolveram amostras da população geral e 43 deles foram conduzidos em uma única clínica ou ambiente hospitalar. A incidência da endometriose foi observada em 16 estudos e variou entre 0,2% a 47%, enquanto que a prevalência da doença variou entre 0,2% a 71,4%. Além disso, a prevalência em estudos populacionais variou entre 0,7% a 8,6% e em estudos de base clínica e/ou hospitalar variou entre 0,2% a 71,4%. Quando analisado pelas indicações diagnósticas, a prevalência da endometriose variou de 15,4% a 71,4% nas mulheres com dor pélvica crônica, 9,0% a 68,0% nas mulheres com infertilidade e 3,7% a 43,3% nas mulheres submetidas à esterilização tubária. Estes dados

sugerem uma extrema variabilidade na incidência e prevalência da endometriose, o que pode ser explicado pela heterogeneidade dos critérios de inclusão e diagnóstico e o viés de seleção apresentados nos artigos incluídos na revisão (GHIASI *et al.*, 2019).

As mulheres com endometriose apresentam sintomas clínicos variados, com diferentes intensidades, sendo os principais, dismenorrea (58,7-97%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-45,7%), dispareunia de profundidade (44-71%), sintomas intestinais e urinários cíclicos (26,3-40,6%), como dor ou sangramento ao evacuar/urinar durante o período menstrual. No entanto, elas podem ser assintomáticas (10,7%), o que dificulta ainda mais o diagnóstico (OZKAN *et al.*, 2008; FAUCONNIER *et al.*, 2013; MORADI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b). Um estudo realizado para descrever as características entre 1000 mulheres com endometriose da Grã-Bretanha, Irlanda e Estados Unidos, mostrou que 34,4% dessas pacientes apresentaram dor pélvica, dismenorrea e dispareunia e 25,2% apresentaram dor pélvica e dismenorrea (Figura 2). Além disso, cerca de 70% dessas mulheres apresentavam, pelo menos, dois dos três tipos de dores ginecológicas. (SINAI *et al.*, 2008).

Figura 2 - Prevalência e sobreposição de sintomas de dores ginecológicas que levaram ao diagnóstico cirúrgico de 940 mulheres com endometriose que participaram do estudo OXEGENE.



Fonte: Adaptado de SINAI *et al.*, 2008.

Chapron e colaboradores, em 2016, realizaram um estudo caso-controle envolvendo 1.008 pacientes da China, Rússia e França. Os autores observaram que na população geral, os

sintomas dolorosos foram mais relatados em pacientes com endometriose quando comparados aos controles, e essa frequência parece estar correlacionada com o fenótipo da doença, aumentando com a gravidade das lesões: endometriose superficial (SUP), endometriose de ovário (OMA) e endometriose profunda/infiltrativa (EPI). Além disso, foi observado que 57,2% das pacientes consideraram a dismenorréia como um impacto real na sua qualidade de vida diária e a contracepção oral foi prescrita para tratar a intensidade da dismenorréia primária em 18,7% dos casos (CHAPRON *et al.*, 2016). Recentemente, Fuldeore e Soliman realizaram um estudo transversal com 59.411 mulheres dos Estados Unidos para avaliar a prevalência e a carga sintomática da endometriose. Como resultado, os autores observaram que a prevalência da doença foi estimada em 6,1% das mulheres do estudo e a maioria delas apresentaram sintomas clínicos antes do diagnóstico (86,2%). Dentre os sintomas, se destacaram a dismenorréia (52,2%) e dor pélvica não cíclica (36,7%), seguida da dispareunia (29,5%) e infertilidade (11,6%) (FULDEORE e SOLIMAN, 2017).

A endometriose pode afetar negativamente a saúde mental e a qualidade de vida das mulheres afetadas, sugerindo que elas podem ter um risco aumentado de desenvolver um sofrimento psicológico, bem como problemas sexuais devido à presença de dor, comprometendo suas relações interpessoais e conjugais. (NNOAHAM *et al.*, 2011; HUGHES *et al.*, 2015; FACCHIN *et al.*, 2015). Um estudo publicado por De Graaff e colaboradores, revelaram que mulheres com endometriose apresentaram uma influência negativa no trabalho (51%), nos relacionamentos (50%) e na educação (16%), devido aos sintomas de dispareunia e dor pélvica crônica. Além disso, das mulheres com dispareunia, 80% tiveram que alterar seu comportamento sexual em termos de interromper ou evitar relações sexuais devido à dor (DE GRAAFF *et al.*, 2013). Em 2015, foi realizado um trabalho para investigar a qualidade de vida, as emoções negativas e as possíveis comorbidades psicopatológicas em pacientes afetadas pela endometriose. Os autores observaram que o grupo de endometriose apresentou frequências significativamente maiores de somatização, depressão, sensibilidade e ansiedade do que o grupo controle. E ainda encontrou um declínio significativo da saúde nas pacientes com endometriose quando comparado aos controles ($P < 0,008$) (LAGANÀ *et al.*, 2015).

Recentemente, foi publicado um estudo que explorou o bem-estar subjetivo, a qualidade de vida relacionada à saúde e a experiência de vida de 500 mulheres australianas com endometriose entre 18 e 63 anos (média = 30,5, desvio padrão = 7,46), na qual preencheram um questionário online que incluía o Índice de Bem-Estar Pessoal, o Perfil de Saúde da Endometriose -30, e várias outras perguntas abertas. Como resultado, os autores observaram baixos níveis de bem-estar subjetivo (escores totais médios do PWI de $51,5 \pm$

2,03) quando comparados aos escores da população geral ocidental (70-80), e a média total de pontuação do Perfil de Saúde da Endometriose -30 indicou uma baixa qualidade de vida relacionado à saúde entre as mulheres incluídas no estudo (78,9, \pm 13,14). Os autores sugerem que a endometriose pode causar um forte impacto negativo no bem-estar subjetivo das mulheres e na sua qualidade de vida, influenciando na produtividade, dificuldades de se relacionarem e na sua insatisfação social, além de aumentar o risco de comorbidades psicológicas, tornando-se um grave problema de saúde pública (RUSH e MISAJON, 2018).

Os dados publicados na literatura reforçam as incertezas e as discrepâncias relacionadas a ocorrência de endometriose no Brasil e no mundo, sendo ainda necessários mais estudos que avalie a epidemiologia e os fatores de risco associados a doença.

2.1.2 Fatores de risco associados à endometriose

Os principais fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento da endometriose estão associados geralmente com a exposição prolongada de estrogênio. Dentre eles se destacam a longa duração do fluxo menstrual (mais de 8 dias), pacientes com menarca precoce, exposição a estrogênio exógenos, como o uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (ABRÃO, 2000; PILLET *et al.*, 2012; NNOAHAM *et al.* 2012; SHAFRIR *et al.*, 2018). Além disso, fatores que podem promover a redução da exposição ao estrogênio assume um papel protetor na endometriose, como a prática de exercícios físicos, maior paridade, dieta hipocalórica e o tabagismo (PARAZZINI *et al.*, 2004; HEILIER *et al.*, 2007; VITONIS *et al.*, 2010; SHAFRIR *et al.*, 2018).

Saha e colaboradores, em 2017, investigaram as relações de fatores reprodutivos e de estilo de vida com a endometriose em 28.822 mulheres gêmeas suecas. Os autores observaram que a idade tardia na menarca e maior paridade apresentavam uma associação inversa com a endometriose, enquanto que a infertilidade mostrou uma forte associação com a doença. Associações positivas também foram observadas com o consumo de café e tabagismo, e uma associação inversa com o uso de contraceptivo oral (CO) na análise bruta, mas não na análise ajustada para fatores de confundimento. Não houve associações significativas entre o nível de educação, índice de massa corporal (IMC), consumo de álcool e a endometriose (SAHA *et al.*, 2017). Recentemente, foi publicado uma revisão da literatura sobre os fatores de risco e as consequências da endometriose para as mulheres. Em resumo, foi observado que a idade precoce na menarca, curto ciclo menstrual e menor IMC acarreta um maior risco de desenvolver endometriose, enquanto que uma maior paridade leva a uma proteção no

desenvolvimento da doença. Além disso, outros resultados menos consistentes com diferentes achados também foram observados como, a atividade física, fatores alimentares, toxinas ambientais, lactação, trabalho noturno e tabagismo, provavelmente devido à necessidade de uma coleta rigorosa de dados e um desenho longitudinal do estudo (SHAFRIR *et al.*, 2018).

Por fim, um fator de risco curioso é o baixo IMC encontrado nas mulheres com endometriose, sendo observado uma associação inversa entre este índice e a doença, tornando-o alvo de muitas investigações hoje em dia (PILLET *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2013; PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b; SHAFRIR *et al.*, 2018).

2.1.2.1 Índice de massa corporal e o desenvolvimento da endometriose

O IMC é um índice estatístico que serve para fornecer uma estimativa da gordura corporal do indivíduo, indicando se o sujeito está no peso ideal, acima ou abaixo do peso desejado (WHO, 1995). Este índice é calculado pelo peso em quilogramas (Kg) do indivíduo dividido pela sua altura em metros quadrados (m²). Segundo a OMS o IMC é categorizado em baixo peso (<18,5 kg/m²), peso normal (18,5 - 24,9 kg/m²), excesso de peso (25 - 29,9 kg/m²), obeso (30 - 39,9 kg/m²) ou obesidade mórbida (≥ 40 kg/m²) (WHO, 1995). Diversos estudos têm observado uma associação significativa entre a endometriose e um baixo IMC, entretanto, os mecanismos dessa associação permanecem um enigma (PILLET *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2013; PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b). Em 2016, Shahbazi e colaboradores avaliaram a associação entre o IMC e a endometriose em uma coorte de 99 mulheres férteis iranianas (46 casos e 53 controles). Após análises de dados, foi observado que o IMC acima de 30 estava presente em 26% dos controles saudáveis e 13% dos pacientes com endometriose. Além disso, as análises de *odds ratio* ajustada (ORa) para variáveis de confundimento, mostraram que um menor IMC está associado a um risco aumentado de endometriose quando comparado com o IMC normal [IMC <18,5 = ORa de 1,7 (IC 95%: 1,3-2,2); IMC 25-29,9 = ORa de 2,1 (IC 95%: 0,8-5,2) e IMC >40 = ORa de 3,2 (IC 95%: 1-10,1)] (SHAHBAZI *et al.*, 2016).

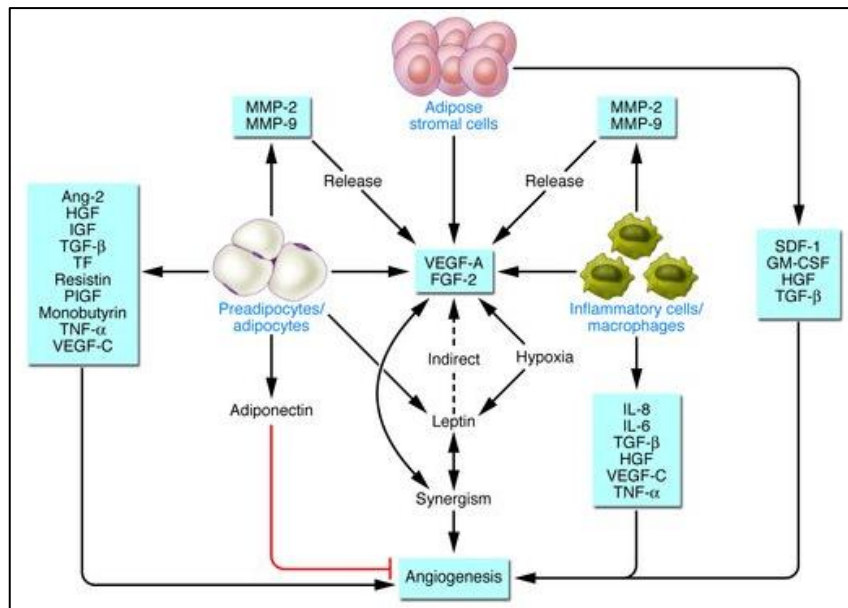
Um estudo multicêntrico (China, Rússia e França) publicado em 2016, teve como objetivo investigar os fatores de riscos associados à endometriose. Pode-se observar pelos resultados obtidos que as mulheres com IMC de 18,5 a 22 apresentaram um risco aumentado para o desenvolvimento da endometriose (OR = 1,45; IC 95% = 1,00 - 2,11), enquanto que aquelas com IMC >25 foram associadas negativamente com a doença (OR = 0,65; IC 95% = 0,44 - 0,96), confirmando a associação inversa que existe entre a endometriose e o IMC

(CHAPRON *et al.*, 2016). No mesmo ano, outro estudo foi publicado a fim de tentar explicar se o fenótipo de baixo IMC observado nas mulheres com endometriose é diretamente atribuível à doença. A partir disso, os autores hipotetizaram que a endometriose pode afetar a expressão gênica hepática, promovendo um baixo IMC. Como resultado foi observado em modelo experimental que a endometriose causa redução do peso corporal e da gordura corporal e interrompe a expressão de genes do fígado (*cytochrome P450 2R1, Leptin, Rho-associated kinase, fatty acid binding protein 4, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, mannose receptor 1, insulin-like growth factor binding protein 1, monocyte-to-macrophage differentiation-associated 2*). Isto sugeri que o metabolismo alterado mediado pelo fígado pode contribuir para o baixo IMC clinicamente observado nas mulheres com endometriose (GOETZ *et al.*, 2016). Além disso, nosso grupo também têm encontrado em estudos publicados anteriormente um baixo IMC nas mulheres com endometriose quando comparado ao grupo controle ($24,4 \pm 4,6$ versus $27,9 \pm 5,7$, $P < 0,001$) (PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b).

Em 2017, foi realizado um trabalho para avaliar as associações entre composição corporal, endometriose e atividade física em 473 mulheres com diagnóstico cirúrgico da doença. Como resultado foi observado que a endometriose foi inversamente proporcional às medidas antropométricas e indicadores de composição corporal, confirmando os dados já publicados anteriormente em outros estudos (BACKONJA *et al.*, 2017).

O estrogênio, por ser também produzido nos adipócitos, está correlacionado com a adiposidade (MAUVAIS-JARVI *et al.*, 2013) e sua redução ou aumento tem sido associado com a prevalência de certos aspectos da síndrome metabólica, incluindo a obesidade (DENG, 2000; OKURA *et al.*, 2003; NILSSON *et al.*, 2007). Além disso, é sabido que o desenvolvimento do tecido adiposo envolve adipogênese e angiogênese (CRANDALL *et al.*, 1997; CAO, 2007), sendo o VEGF responsável por grande parte da atividade angiogênica desse tecido (Figura 3) (LOHELA *et al.*, 2009). Nishimura e colaboradores mostraram que a administração de anticorpos anti-VEGF inibe não apenas a angiogênese, mas também a adipogênese, fornecendo evidências diretas de que a angiogênese é essencial para a adipogênese na obesidade (NISHIMURA *et al.*, 2007). Outros estudos já mostraram que os níveis circulantes de VEGF são elevados em indivíduos com sobrepeso e obesidade (SILHA *et al.*, 2005) e estão correlacionados positivamente com o IMC (LOEBIG *et al.*, 2010; ERMAN *et al.*, 2016).

Figura 3 - Regulação da angiogênese do tecido adiposo por múltiplos fatores.



Fonte: CAO, 2007. A diversidade de populações celulares no tecido adiposo, incluindo pré-adipócitos e adipócitos, células de estroma adiposo e células inflamatórias, contribui para a produção de múltiplos fatores angiogênicos e inibidores que regulam a angiogênese adiposa. A interação entre diferentes fatores pode resultar em sinergismo angiogênico. Por exemplo, leptina e VEGF-A ou FGF-2 poderiam estimular sinergicamente a angiogênese. A hipoxia do tecido pode aumentar a regulação positiva dos níveis de expressão de VEGF e leptina. E as MMPs poderiam aumentar a biodisponibilidade de fatores angiogênicos pela liberação do VEGF ligado a matriz.

Os recentes avanços na tecnologia genética levaram à descoberta de novos genes para a obesidade e suscetibilidade à infertilidade, uma vez que a história familiar e os fatores genéticos desempenham um papel em ambas as condições (BULTLER *et al.*, 2015). Polimorfismos em genes relacionados à síntese e metabolismo de estrogênio e à angiogênese têm sido associados com a adiposidade anormal (OKURA *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2002). Em 2012, foi realizado um estudo para avaliar a associação de SNPs em 38 genes envolvidos com a obesidade em afro-americanos ($n = 1.173$) e caucasianos ($n = 1.165$). Como resultado foi observado que o alelo variante (A) para o SNP rs1902584 do gene *CYP19A1* foi associado a um aumento no IMC, mas esse SNP não permaneceu associado após correção para testes múltiplos. Entretanto, foi observado uma associação positiva do alelo variante desse SNP em pacientes caucasianas que apresentavam um IMC ≥ 35 (OR= 1,91; IC 95% = 1,26 - 2,88). (EDWARDS *et al.*, 2012). Recentemente, um trabalho de associação genoma wide (GWAS) realizado com 3194 casos de endometriose e 7060 controles, concluiu que o locus 7p15.2 está associado com a endometriose e a distribuição de gordura corporal, sugerindo que estes fatores podem ter uma base genética compartilhada (RAHMIOGLU *et al.*, 2015). Embora os dados epidemiológicos possam ser utilizados para uma melhor

compreensão da endometriose, outros estudos precisam investigar a genética, o meio ambiente e a fisiopatologia do IMC em mulheres com endometriose.

2.1.3 Diagnóstico da endometriose

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva classifica a endometriose em quatro estágios: I (mínima - escore 1-5, implantes isolados e sem aderências significantes), II (leve - escore 6-15, implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significantes), III (moderado - escore 16-40, múltiplos implantes aderências peritubárias e periovarianas evidentes) e IV (severo - escore > 40, múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes); este sistema de escores é baseado na localização, extensão e profundidade das lesões endometrióticas, na presença e severidade das aderências e na presença e tamanho de endometriomas ovarianos (ASRM, 1997).

Macroscopicamente, existem três fenótipos de lesões endometrióticas: a endometriose peritoneal superficial (SUP), que inclui as pacientes com implantes peritoneais; o endometrioma (OMA), que inclui os cistos ovarianos típicos da doença; e a endometriose profunda infiltrativa (EPI), que acomete as regiões retrocervical e paracervical, além dos tratos gastrointestinais e genitourinário (NISOLLE e DONNEZ, 1997). Além disso, Bellelis e colaboradores classificam a endometriose de acordo com a profundidade da lesão em: endometriose superficial quando sua profundidade é menor do que 5 mm; e endometriose profunda quando esta profundidade é maior do que 5 mm (BELLELIS *et al.*, 2010).

O diagnóstico da endometriose não é tão simples de ser realizado, já que muitas vezes a paciente é assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos que não orientam quanto a sua presença e desse modo dificulta o diagnóstico precoce e assim uma terapêutica de forma rápida (BALLARD *et al.*, 2006). Para se verificar com precisão os focos da doença é necessária a realização de laparoscopia, no entanto, o conjunto de diversos achados como a história clínica da paciente, o exame físico e os exames de imagem já podem predizer que a paciente apresenta endometriose (NÁCUL e SPPRITZER, 2010).

O diagnóstico clínico da endometriose tem como base a exploração dos sintomas e o exame ginecológico, com a realização do toque vaginal bimanual para poder detectar algum tipo de nódulo doloroso à palpação no fórnice vaginal posterior (CHEEWADHANARAKS *et al.*, 2004; MACCAGNANO *et al.*, 2012).

O diagnóstico por imagem é indicado quando a paciente apresenta os sintomas clínicos da endometriose e quando no exame ginecológico há dor ao toque vaginal, sugerindo

a presença da doença. Após isso, é indicada a realização de exames de imagem para tentar identificar e caracterizar as lesões da endometriose, como a ultrassonografia transvaginal (USTV) e a ressonância nuclear magnética (RNM) (HOYOS *et al.*, 2017). A USTV tem sido proposta como a técnica de primeira linha para avaliar as pacientes com suspeita de endometriose, pois permite a exploração extensiva da pélvis, além de ter um custo menor para o sistema único de saúde (SUS) do que a RNM (LEYLAND *et al.*, 2010). No entanto, o valor diagnóstico da USTV para a avaliação de lesões superficiais e profundas é menos sensível e específico em comparação à RNM (GUERRIERO *et al.*, 2013). Saccardi e colaboradores observaram que a USTV, embora realizada por um operador experiente, alcançou uma boa especificidade (87,5%), mas uma menor sensibilidade (73,9%) com um valor preditivo negativo (VPN) de 36,8% (SACCARDI *et al.*, 2012).

A RNM é uma ferramenta de imagem extremamente poderosa na avaliação de pacientes com endometriose, pois sua capacidade multiplanar direta e sua alta resolução tecidual são particularmente úteis na detecção de implantes de endometriose profunda (GUERRIERO *et al.*, 2013). Além de não ser uma técnica invasiva, a RNM pode ser realizada em mulheres em sua idade reprodutiva, pois nenhuma radiação ionizante é usada para gerar as imagens. No entanto, perde para o ultrassom em termos de aplicabilidade no cotidiano por apresentar um alto custo para as pacientes, além de ser necessária a presença de um radiologista habilitado para a identificação dos focos de endometriose (HOTTAT *et al.*, 2009). Bodzak e colaboradores, em 2013, avaliaram dados atuais sobre a acurácia diagnóstica da RNM na avaliação da endometriose e compararam com outros métodos de diagnóstico e concluíram que a RNM é uma ferramenta útil na avaliação de pacientes com endometriose (sensibilidade = 73-96,3%; especificidade = 70-100%), tanto como um método autônomo, como um método complementar ao ultrassom transvaginal, além de permitir o mapeamento preciso de implantes de endometriose profunda (BIANEK-BODZAK *et al.*, 2013).

Apesar dos métodos de imagens apresentarem uma boa especificidade e sensibilidade no diagnóstico da endometriose, o padrão ouro para diagnóstico de endometriose, segundo consenso da Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) e da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (American Society for Reproductive Medicine - ASRM), é a videolaparoscopia com a inspeção direta da cavidade e visualização dos implantes, além da confirmação histopatológica da doença (ASRM, 1997; ESHRE, 2008). Entretanto, recentemente, um estudo publicado com a participação de um dos nossos colaboradores, avaliou e discutiu criticamente a classificação atual da endometriose de acordo

com a presença de dor. De acordo com os autores para se ter um sistema ideal de classificação da endometriose com relação à dor deve-se fornecer informações sobre a gravidade e o tipo de endometriose; correlacionar-se com a gravidade e o tipo de sintoma, incluindo dor e infertilidade; ser mais acessível, reproduzível e fácil de executar; e fornecer informações sobre o prognóstico da doença. Como conclusão, foi observado que nenhum dos sistemas de classificação de endometriose atualmente inclui todas essas informações, sendo ainda necessário mais esforços no tocante à classificação da doença, para alcançar um sistema ideal, incluindo o nível de dor na classificação da endometriose (ANDRES *et al.*, 2018).

Ainda hoje, alguns clínicos solicitam como exame complementar para o diagnóstico de endometriose, o marcador CA125 (antígeno de câncer 125), entretanto ele não é específico para esta doença (ABRÃO, 2000; RUAN *et al.*, 2015). Na busca de um biomarcador específico para endometriose, um estudo realizado por Berg e colaboradores, em 2013, avaliou a distribuição do receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), da molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), do receptor de estrogênio (ER), do receptor de folato - α (FR- α), do fator hipóxia-induzida 1 α (HIF-1 α), do receptor de progesterona (PGR), e do fator de crescimento endotelial vascular – A (VEGF-A) em tecido endometrial e concluiu que os marcadores EpCAM, FR- α , e VEGF-A parecem ser os mais promissores, visto que foram altamente distribuído no tecido endometrial de pacientes com endometriose (VAN DEN BERG *et al.*, 2013).

A indicação inicial da endometriose normalmente é baseada em uma gama de sintomas que a paciente pode apresentar e por isso, a doença é caracterizada por longos atrasos no diagnóstico (NNOAHAM *et al.*, 2011), com até 74% das pacientes que receberam pelo menos um diagnóstico falso (HUDELIST *et al.*, 2012). Em 2016, um estudo retrospectivo avaliou o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico de endometriose em um grupo de 139 mulheres holandesas, sendo que a mediana do atraso do diagnóstico foi de 7,4 anos, dividido em 7 meses de atraso do paciente, 35 meses de atraso do médico da clínica geral e 5 meses de atraso do ginecologista. Além disso, relataram que os determinantes para um atraso no diagnóstico foi a idade jovem no início dos sintomas, o uso de contraceptivos orais ou analgésicos prescritos por clínico geral, os diagnósticos alternativos considerados pelo clínico geral e os sintomas cíclicos. Enquanto que a subfertilidade, como sintoma de apresentação, resultou em um diagnóstico mais rápido (STAAL *et al.*, 2016).

Recentemente, Coutinho e colaboradores realizaram uma revisão exploratória da literatura a fim de discutir sobre os possíveis biomarcadores para o diagnóstico da

endometriose. Contudo, a grande maioria dos biomarcadores com potencial diagnóstico foi descartado logo na fase de pesquisa e apenas o CA-125 permaneceu para a prática clínica, no entanto ele não é específico para a endometriose. Dentre eles encontram-se fatores envolvidos no processo inflamatório crônico da endometriose, como hormônios (aromatase, receptores do estrogênio e da progesterona, prolactina, leptina, hormônio luteinizante e tireotrófico, activina A, folistatina e urocortina 1), citocinas (interleucina-6, 19, 22 e 33 e fator de necrose tumoral-alfa), quimiocinas (interleucina-8, proteína 1 quimioatrativa de monócitos e ligante 5 da quimiocina motivo C-C), fatores angiogênicos (VEGF), marcadores de estresse oxidativo (paraoxonase-1, carbonilas e tióis), entretanto, nenhum conseguiu com sucesso identificar com precisão a doença. Por fim, a busca por um biomarcador ou até um conjunto deles ainda é um campo amplo, sendo possível, hoje em dia, se beneficiar das novas abordagens de biologia molecular e bioinformática para explorar e descobrir perfis moleculares associados à doença (COUTINHO *et al.*, 2019).

Dessa forma, até o momento, ainda não existe um biomarcador com especificidade adequada para o diagnóstico e/ou prognóstico da endometriose (ABRAO *et al.*, 2003; ABRÃO *et al.*, 2015; AHN *et al.*, 2017; COUTINHO *et al.*, 2019). Assim, existe ainda um campo vasto de investigação nesta área, tendo em vista que entender os fatores envolvidos no desenvolvimento dos focos de endometriose, bem como a etiopatogenia da doença, pode contribuir e direcionar esforços para otimizar o diagnóstico e direcionar o tratamento da endometriose.

2.1.4 Tratamento da endometriose

O alívio dos sintomas constitui o principal objetivo do tratamento da endometriose, já que o arsenal medicamentoso existente não dispõe de nenhum fármaco capaz de erradicar por completo os focos ectópicos de tecido endometrial que caracterizam a doença (ABRÃO, 2000; NÁCUL e SPRITZER, 2010). O tratamento de escolha depende da idade da paciente, a presença de infertilidade, o número de órgãos afetados, a gravidade dos sintomas, ou uma patologia pélvica associada. (NÁCUL e SPRITZER, 2010). Dentre os tratamentos clínicos mais difundidos para a endometriose estão as combinações estroprogestogênicas, progestogênios isolados e análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Esses agentes inibem o crescimento dos implantes por decidualização e atrofia do endométrio ou por meio da supressão dos hormônios esteróides ovarianos e indução de um estado de hipostrogenismo (NÁCUL e SPRITZER, 2010; FERRERO *et al.*, 2015; TAFI *et al.*, 2015).

O uso de inibidores de aromatase, uma das enzimas envolvidas na síntese do estrogênio, bem como de medicamentos que associam estrogênio e progesterona em diferentes doses, têm se mostrado eficazes no tratamento da dor associada à doença e acarretam menos efeitos adversos do que análogos do GnRH. Por essa razão, atualmente, os estroprogestogênicos são a primeira escolha no tratamento da dor associada à endometriose, seguidos pelos progestogênios isolados e pelos análogos de GnRH, em último caso. (MARQUI, 2015)

O tratamento cirúrgico da endometriose compreende desde procedimentos de baixa complexidade, como cauterização de focos superficiais e liberação de aderências velamentosas, até intervenções complexas nos ovários, intestino, bexiga e ureteres. Contudo, a vídeo-laparoscopia assume um papel relevante no controle da endometriose, pois permite ao ginecologista identificar e remover todos os focos da doença durante o ato cirúrgico (KHO e ABRÃO, 2012). Atualmente, sabe-se que não há associação entre a gravidade dos sintomas e a extensão da doença, bem como com o prognóstico reprodutivo de infertilidade e de recorrência de dor em longo prazo (VERCELLINI *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2015). Por isso muitas vezes se preconiza o tratamento cirúrgico apenas para pacientes que não respondam ao tratamento medicamentoso, bem como para aquelas que desejam engravidar espontaneamente (VERCELLINI *et al.*, 2009).

O tratamento para a endometriose traz um encargo econômico considerável, tanto para as pacientes como para o sistema público de saúde. Fuldeore e colaboradores, em 2015, realizaram um estudo retrospectivo nos Estados Unidos, envolvendo pacientes com endometriose, sobre a utilização de recursos de saúde e dos custos com o diagnóstico e tratamento com dados pré e pós-diagnóstico, em comparação a uma coorte de mulheres sem a doença. As pacientes com endometriose apresentaram uma extensa utilização dos serviços de ambulatório e sala de emergência durante todos os 10 nos de seguimento e uma maior utilização dos serviços hospitalares durante os cinco anos pós-diagnóstico (tratamento). Além disso, os custos totais para pacientes com endometriose foram maiores no primeiro ano de pós-diagnóstico, atingindo \$13.199 dólares, em comparação com \$3.747 dólares para os controles (FULDEORE *et al.*, 2015). Além disso, recentemente, foi realizada uma análise de dados secundários no período de 2008 a 2012, a fim de determinar a carga econômica de pacientes com EPI na Alemanha. Foram analisados os dados de 825 mulheres com EPI, sendo que 41% dessas pacientes apresentaram pelo menos uma doença adicional do peritônio. Os custos totais de cuidados de saúde por caso de EPI foram de 12.868 euros no ano de diagnóstico. Antes da cirurgia, os custos anuais médios variaram entre 548 e 2.475 euros por caso e após a cirurgia entre 1.739 e 2.818 euros por caso. No total, os custos médios foram

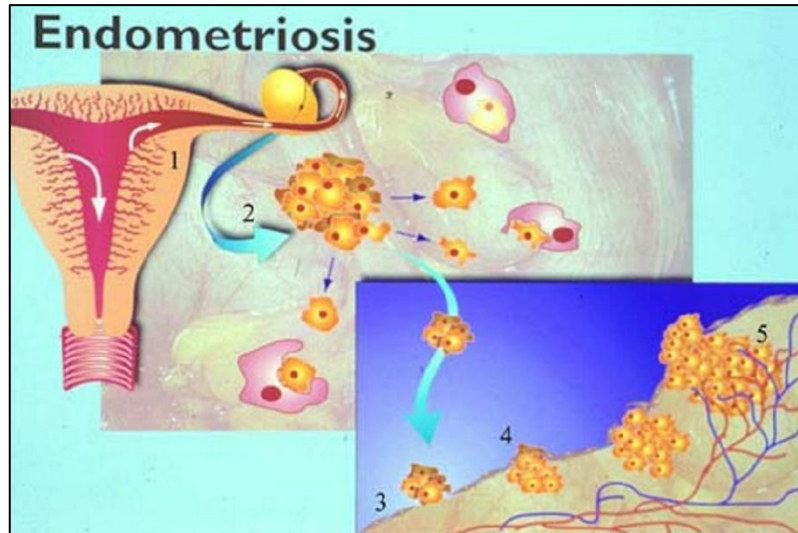
mais elevados nas mulheres mais jovens em comparação com as mulheres mais velhas, com uma diferença de custo de 616 euros (KOLTERMANN *et al.*, 2016).

2.1.5 Etiologia da endometriose

A origem da endometriose ainda não está totalmente esclarecida, no entanto, existem múltiplas teorias que tentam explicar o surgimento da doença, como a menstruação retrógrada, a metaplasia, os fatores imunes e genéticos (ASGHARIA *et al.*, 2018).

Até o momento, a teoria mais aceita é a da menstruação retrógrada proposta por Sampson em 1927, a qual sugeriu que durante a menstruação fragmentos endometriais sofrem fluxo menstrual retrógrado, retornando pelas tubas uterinas, onde se aderem e infiltram-se na cavidade peritoneal favorecendo o surgimento dos focos endometrióticos (Figura 4). Isso pode ser sustentado pelos estudos realizados em meios de cultura e em animais, na qual os fragmentos de endométrio quando transplantados levam à formação dos focos de endometriose (KOKS *et al.*, 1997; GIUDICE *et al.*, 2010).

Figura 4 - Teoria da menstruação retrógrada.



Fonte: GROOTHUIS *et al.*, 2005. Durante a menstruação fragmentos do endométrio sofrem refluxos (1) através das tubas uterinas para dentro da cavidade abdominal (2). Os fragmentos se aderem à superfície peritoneal (3), invadem (4), e adquirem um suprimento de vasos sanguíneos (5).

Apesar da teoria da menstruação retrógrada ser bem aceita, os mecanismos celulares e moleculares ainda não estão claros, pois o fluxo menstrual retrógrado é um processo fisiológico que ocorre em aproximadamente 90% das mulheres, sendo o sistema imune capaz de eliminar esses restos de fragmentos e prevenir implantações e crescimento endometriais futuros (SIMPSON, 2000). Assim, um mau funcionamento do sistema imunológico também contribui para o surgimento da endometriose, uma vez que os fragmentos endometriais fora da cavidade uterina não são reconhecidos por este sistema (AHN *et. al.*, 2015; JEUNG *et. al.*, 2016). Diversos estudos têm observado que os níveis de macrófagos ativados, células B, células T e citocinas inflamatórias estão aumentados em mulheres com endometrioses, podendo estar gerando um ambiente propício para o crescimento e sobrevivência do tecido endometrial ectópico, em vez da extinção destes implantes. (D'HOOGHE *et. al.*, 2003; KHAN *et. al.*, 2008; JEUNG *et. al.*, 2016).

Outra teoria proposta foi a de Meyer e colaboradores na qual sugeriram que as lesões endometrióticas podem se originar de células do peritônio que, submetidas ao estrogênio, sofreram metaplasia e passaram a exibir características de células endometriais (teoria da metaplasia celômica) (ROBBOY e BEAN, 2010). Os estudos que suportam essa teoria possuem evidências que o epitélio e as glândulas endometriais são resultado de indução, mas não há evidências de formação de estroma endometrial no final do processo metaplásico (ABRÃO, 2000).

As propriedades hereditárias ou adquiridas do endométrio e peritônio são outra possível explicação para o surgimento da endometriose e têm sido altamente investigadas na busca de fatores que influenciam a predisposição para a implantação das células endometriais (BURNEY e GIUDICE, 2012), visto que a maioria das mulheres apresentam a menstruação retrógrada, mas apenas uma minoria desenvolve a doença (BRICOU *et al.*, 2008). A etiologia genética da endometriose é complexa e contribui com aproximadamente metade de variação do risco de desenvolvimento da doença, com uma estimativa de herdabilidade de 51%. (VERCELLINI *et al.*, 2013). Desse modo, a suscetibilidade genética na endometriose tem sido uma área crescente na identificação de polimorfismos genéticos que poderiam influenciar no desenvolvimento da doença (BURNEY e GIUDICE, 2012). Um estudo entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) com história de endometriose autorreferida ou validada por registros médicos, que participaram dos projetos de pesquisa *Screening Across the Lifespan Twin* (SALT) (1998–2002) ou *Swedish Twin Study of Adults' Genes and Environments* (STAGE) (2005–2006), mostrou uma contribuição genética de 47% (95 % IC, 36% - 57%) para a herdabilidade da endometriose, reforçando a hipótese da influência genética nas manifestações fenotípicas da doença (SAHA *et al.*, 2015).

Apesar dessas diferentes teorias propostas para explicar o desenvolvimento da endometriose, a etiologia da doença continua sendo um campo vasto para investigações. Como descrito anteriormente, o estrogênio é um hormônio predominante nas pacientes com endometriose, e o estudo de sua síntese e regulação, principalmente pela ação da progesterona, poderia ajudar a compreender a fisiopatologia dessa doença (BARBOSA *et al.*, 2011; BRAR *et al.*, 2015).

2.2 PAPEL FISIOLÓGICO DO ESTROGÊNIO E DA PROGESTERONA NO CICLO MENSTRUAL

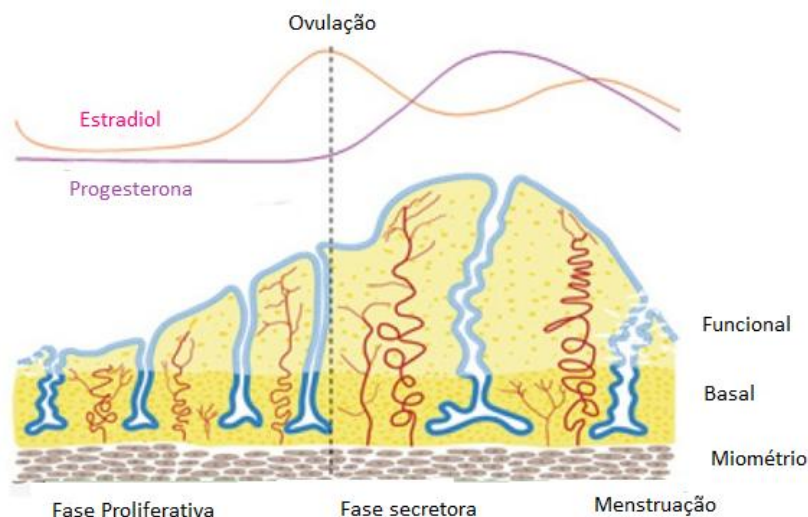
O estrogênio é um hormônio esteroide produzido principalmente pelos folículos ovarianos estando envolvido no desenvolvimento de características femininas, sendo a estrona, o estradiol e o estriol os principais estrógenos presente nas mulheres (SAMAVAT e KURZER, 2015; SILVA *et al.*, 2015; BERNARDI *et al.*, 2019). Já a progesterona é um hormônio também esteroide relacionado com a reprodução e implantação embrionária, produzida majoritariamente pelo corpo lúteo, sendo uma importante precursora na biossíntese de todos os hormônios sexuais (testosterona e estrogênio). (LIANG *et al.*, 2018). Ambos os hormônios tem o papel de influenciar de maneira cíclica o endométrio, mucosa que reveste

internamente a parede uterina, fazendo com que as células desse tecido sofram mudanças na preparação para a implantação embrionária (TABIBZADEH, 2002).

O endométrio é composto pelas camadas funcional e basal, sendo a funcional voltada para o lúmen do útero, e a basal localizada ao lado do miométrio (camada muscular do útero). Vale ressaltar que a camada funcional é a que mais sofre ação hormonal e se desprende da camada basal durante o processo de menstruação, sendo posteriormente reconstituída no ciclo seguinte (Figura 5). Histologicamente, o endométrio é uma estrutura composta por glândulas tubulares simples envolvidas por um estroma endometrial amplamente vascularizado (TABIBZADEH, 1990; EMMERSON e GARGETT, 2016).

O ciclo menstrual geralmente dura 28 dias (Figura 5), podendo variar entre 21 e 35 dias, sendo dividido em três fases: menstrual, proliferativa e secretora (BRAR *et al.*, 2015). O primeiro dia do ciclo é o primeiro dia da menstruação, com a descamação do endométrio. Posteriormente, a fase proliferativa inicia o remodelamento tecidual, sendo caracterizada por uma intensa divisão das células e glândulas do endométrio mediada por um aumento dos níveis de estrógenos. Após a ovulação, se inicia a fase secretora, na qual ocorre a maturação do endométrio pela diminuição dos níveis de estrogênio e um aumento nos níveis de progesterona, que reduz a proliferação celular. Caso não ocorra a fecundação, inicia-se novamente a fase menstrual, onde há a diminuição dos hormônios estrogênio e progesterona provocando a descamação do endométrio funcional (menstruação). (TABIBZADEH, 2002; AITKEN *et al.*, 2008; BRAR *et al.*, 2015; EMMERSON e GARGETT, 2016).

Figura 5 - Esquema das alterações no endométrio humano durante o ciclo menstrual, ilustrando o crescimento, diferenciação e degradação das camadas funcionais.



Fonte: Adaptado de Emmerson e Gargett, 2016.

Outro importante papel dos hormônios sexuais femininos no ciclo menstrual é a sua influência direta na liberação e atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), na qual são responsáveis por manter o equilíbrio entre o processo de síntese e degradação de proteínas da matriz extracelular (BRUNER-TRAN *et al.*, 2002). À medida que os níveis de estradiol e progesterona mudam ao longo do ciclo menstrual, também ocorre a alteração na expressão das MMPs (GRZECHOCIŃSKA *et al.*, 2017).

As MMPs são um grupo de proteínas enzimáticas com atividade proteolítica e derivam da família das endopeptidase (SNOEK-VAN BEURDEN *et al.*, 2005). A atividade dessas enzimas na superfície do endométrio indica seu papel inicial na degradação da parede arterial durante o sangramento menstrual, entretanto seus níveis são diferentes ao longo do ciclo menstrual (HENRIET *et al.*, 2002). A maioria das MMPs tem sua expressão máxima na menstruação, mas outras permanecem indetectáveis na fase proliferativa ou secretora e ainda existem aquelas que permanecem constantes durante todo o ciclo menstrual (NOGUCHI *et al.*, 2003). Por fim, a transformação endometrial cíclica, proliferação, alterações secretoras, bem como a coordenação desses processos, dependem diretamente das MMPs (GRZECHOCIŃSKA *et al.*, 2017).

No entanto, um desequilíbrio hormonal durante o ciclo pode favorecer o surgimento da endometriose, fazendo com que as mulheres, principalmente em idade reprodutiva, tenham uma alta resposta ao estrogênio e uma baixa resposta à progesterona (ESKENAZI e WARNER, 1997; FERRERO *et al.*, 2014, PATEL *et al.*, 2017; SUSHEELAMMA *et al.*, 2018).

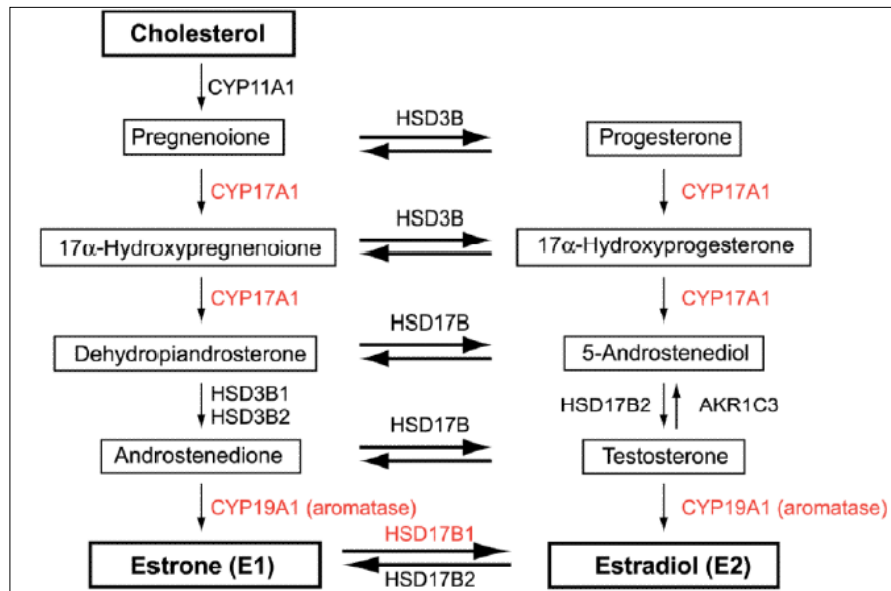
2.3 ESTROGÊNIO, PROGESTERONA E MMP NA ENDOMETRIOSE

Diversos estudos reportam um aumento na produção de estrogênio em mulheres com endometriose (HAN *et al.*, 2015; IZAWA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Delvoux e colaboradores, em 2009, comprovou que as lesões endometrióticas são capazes de criar um ambiente hiperestrogênico mediante um aumento da conversão de estrona em estradiol e uma diminuição da conversão de estradiol em estrona (DELVOUX *et al.*, 2009). Além disso, a proliferação dos fragmentos endometrióticos requer presença de estradiol, que é fornecido pelos hormônios sistêmicos, e também localmente a partir do aumento da expressão da aromatase e da proteína reguladora aguda esteroidogênica e a

diminuição da expressão da 17 β -hidroxisteróide desidrogenase 2 pelas lesões endometrióticas (ZONDERVAN *et al.*, 2020).

Existem diversas enzimas relacionadas à produção dos estrógenos (Figura 6), sendo a CYP17A1, a CYP19A1 e a CYP2C19 envolvidas nas principais etapas desta via (CHENG *et al.*, 2001; BELL *et al.*, 2008; DALY, 2015). A CYP17A1, também conhecida como 17 alfa-hidroxilase, é uma das enzimas responsáveis pelas etapas iniciais da síntese dos estrógenos, convertendo a pregnenolona em 17 α -hidroxipregnenolona e, posteriormente, em dehidroepiandrosterona. Já a CYP19A1, também conhecida como aromatase, é responsável pelas etapas finais da síntese dos estrógenos, convertendo androstenediona em estrona e testosterona em estradiol (BELL *et al.*, 2008). A CYP2C19 está envolvida no metabolismo do estradiol, principal hormônio sexual feminino, e da estrona, que é o segundo estrogênio predominante na circulação da mulher, participando do catabolismo destes hormônios (CHENG *et al.*, 2001; CRIBB *et al.*, 2006; LAVADO *et al.*, 2014). Além disso, também está envolvida no metabolismo de muitos medicamentos (LU *et al.*, 2017), na desintoxicação de possíveis carcinógenos (YAN *et al.*, 2014) e na bioativação de alguns procarcinogênicos ambientais (DZUL-CAAMAL *et al.*, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática da biossíntese e metabolismo do estrogênio.



Fonte: Adaptado de Bell et al, 2008. A conversão enzimática do colesterol em estrógenos 17 β -estradiol e estrona é um processo que envolve várias etapas catalisado pelos membros da família citocromo P450 (CYP), 3 β -hidroxisteróide desidrogenase (HSD3B) e 17 β -hidroxisteróide desidrogenase (HSD17B).

A progesterona também está envolvida na patogênese da endometriose, pois é um potente antagonista do estrogênio e, dessa forma, tem papel essencial na regulação da proliferação de células endometriais (VAN KAAM *et al.*, 2007). A ação da progesterona é mediada pela interação com seu receptor, que possui duas isoformas, a PR-A e a PR-B (VAN KAAM *et al.*, 2007; LAMP *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2015). Em circunstâncias normais, a progesterona, agindo principalmente via PR-B, é necessária para a transição apropriada da fase proliferativa para a secretora. Além disso, na maioria dos tipos celulares, o PR-B possui uma forte atividade transcricional, enquanto que o PR-A, possui uma atividade transcricional mínima, podendo também reprimir a atividade transcricional do PR-B (GIANGRANDE *et al.*, 2000).

Em 2015, Bedaiwy e colaboradores compararam a abundância e a localização celular das isoformas do receptor da progesterona (PR-A ou PR-B) no endométrio eutópico de mulheres com (n = 18) e sem endometriose (n = 20) e nas lesões endometrióticas (peritoneal e ovariana; n = 18) usando ensaios de imuno-histoquímica e imunoblotting. Foi observado que os níveis das isoformas PR-A e PR-B foram detectados no endométrio eutópico e na endometriose peritoneal e ovariana, mas não no peritônio livre de doença de pacientes com e sem endometriose. Além disso, o nível médio de PR-A foi significativamente maior no endométrio das mulheres com endometriose em ambas as fases secretora e proliferativa quando comparado com os controles. Por fim, também foi mostrado que a endometriose ovariana tem maior predominância da isoforma PR-A em comparação com a peritoneal. Estes dados sugerem que o aumento da razão PR-A/PR-B contribui para o desenvolvimento e a progressão da doença (BEDAIWY *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Wölfler *et al.*, em 2016 avaliaram a expressão de PR-A e PR-B no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (n = 16) em comparação com mulheres sem a doença (n = 10) ao longo do ciclo menstrual. Foi observado que não houve qualquer alteração na expressão de PR-A e PR-B dependente do ciclo nas mulheres portadoras de endometriose, ao contrário do grupo controle, que apresentou expressão aumentada de PR-A e PR-B no início da fase secretora. Estes resultados sugerem que a expressão irregular das isoformas PR-A e PR-B durante o ciclo menstrual pode influenciar nos implantes endometrióticos iniciais, bem como na liberação e atividade das metaloproteinases (WÖLFLER *et al.*, 2016).

Dentre as MMPs com maior atividade estromal e peri-arterial durante o sangramento menstrual destaca-se a MMP-3 (estromelisin-1). Esta MMP é conhecida por lisar o colágeno

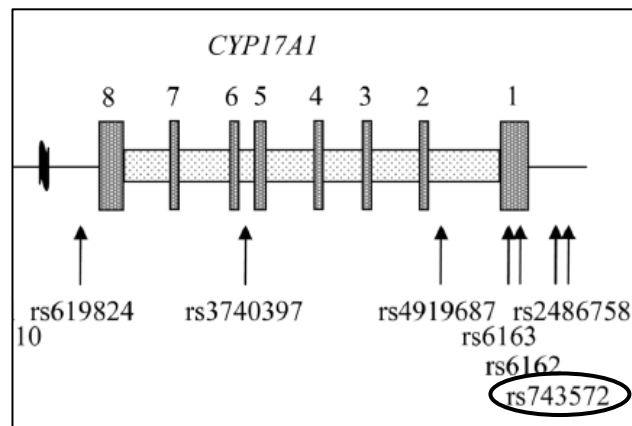
IV da membrana basal e induzir a síntese de outras metaloproteinases de matriz (MMPs), tais como a MMP-1 e a MMP-9 (BRINCKERHOFF *et al.*, 2000, VAN THEMSCHE *et al.*, 2004). A MMP-3 pode participar do processo de invasão e remodelação tecidual no endométrio ectópico, que é a principal hipótese na patogênese da endometriose (COX *et al.*, 2001). Além disso, a MMP-3 é amplamente expressa durante o ciclo menstrual e exibe padrões de expressão específicas no momento do reparo e crescimento do endométrio mediado pelo estrogênio (RODGERS *et al.*, 1994). Gilabert-Estelle's e colaboradores mostraram que a expressão do mRNA da *MMP-3* foi significativamente maior no endométrio de mulheres com endometriose do que nos controles (GILABERT-ESTELLE'S *et al.*, 2007), confirmando alguns estudos anteriores que verificaram o mesmo efeito (SILLEM *et al.*, 2001; GILABERT-ESTELLE'S *et al.*, 2003). Corroborando com esses resultados, foi demonstrada uma diferença significativa no nível do mRNA da *MMP-3* no sangue periférico de mulheres com endometriose infiltrativa (1.56; 0.2–5.5) e ovariana (1.42; 0.3–6.5) quando comparado aos controles (1; 0.1–1.9), sugerindo que este gene pode ter um papel importante no desenvolvimento da doença (MABROUK *et al.*, 2012).

Portanto, enzimas envolvidas no metabolismo e ação dos hormônios estrogênio e progesterona, atuam em conjunto na regulação do crescimento do tecido endometrial ectópico, estimulando e inibindo a proliferação celular, respectivamente, sendo alvos importantes para o entendimento da patogênese da endometriose (BARBOSA *et al.*, 2011).

2.3.1 Polimorfismos em genes que codificam as enzimas envolvidas na via dos hormônios sexuais femininos.

A enzima CYP17A1 é codificada pelo gene de mesmo nome, localizado no braço longo do cromossomo 10 (CAREY *et al.*, 1994). Dentre os polimorfismos já descritos no gene *CYP17A1* (Figura 7), destaca-se o SNP -34A>G (rs743572), localizado na região 5' não traduzida (5'UTR) do gene. A presença do SNP cria um sítio promotor adicional (CCACC Box), aumentando a transcrição da enzima 17 alfa-hidroxilase, resultando a produção de mais andrógenos precursores que são posteriormente convertidos em estrogênio (HAIMAN *et al.*, 1999; GHISARI *et al.*, 2014).

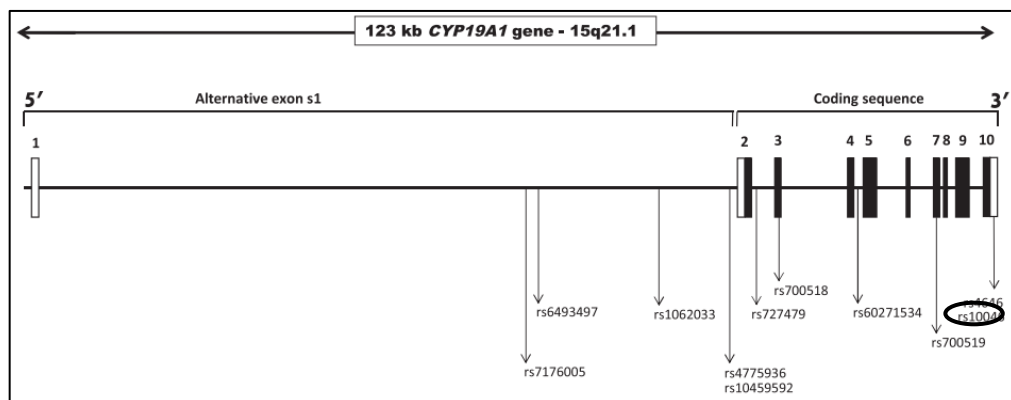
Figura 7 - Estrutura do gene *CYP17A1* e localização dos SNP, com destaque ao SNP -34 A>G (rs743572).



Fonte: Adaptado de ZHAO *et al.*, 2008. O SNP -34 A>G (rs743572) está destacado em círculo.

A enzima CYP19A1 é codificada pelo gene de mesmo nome, que está localizado no braço longo do cromossomo 15 (GHISARI *et al.*, 2014). O gene *CYP19A1* também é bastante polimórfico e o SNP 1531G>A (rs10046) está localizado na região 3'UTR deste gene (Figura 8), responsável por provocar alteração nos níveis de estradiol circulante (GHISARI *et al.*, 2014).

Figura 8 - Estrutura do gene *CYP19A1* e localização do SNP 1531G>A (rs10046).

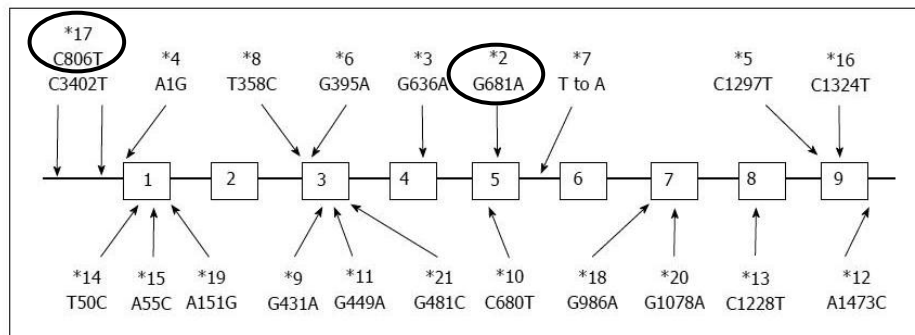


Fonte: Adaptado de ARTIGALÁS *et al.*, 2015. O SNP 1531G>A (rs10046) está destacado em círculo.

A CYP2C19 é uma proteína codificada pelo gene de mesmo nome, localizada no braço longo do cromossomo 10, composta por 490 aminoácidos e com peso molecular aproximado de 55 KDa (kilodalton) (XIE *et al.* 2001). Entre as variantes alélicas conhecidas desta enzima, se destacam o *CYP2C19*2*, localizado no éxon 5, caracterizado pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 681 (681G>A) e o *CYP2C19*17*,

localizado na região promotora do gene, caracterizado pela substituição de uma citosina por uma timina na posição -806 (806C>T) (Figura 9). Estes por sua vez, são classificados como metabolizadores lentos e ultra-rápidos, respectivamente, resultando na diminuição ou no aumento da capacidade metabólica da enzima CYP2C19 (SIBBING *et al.*, 2010; DALY, 2015). O CYP2C19*2 é um SNP sinônimo na qual não causa alteração no aminoácido, mas cria um local de splicing alternativo, resultando em uma proteína truncada e não funcional (DE MORAIS, 1994). Já o CYP2C19*17, por este SNP está localizado em uma região regulatória, pode influenciar no nível de expressão da proteína, aumentando a transcrição do gene CYP2C19 de 2-4 vezes (SIBBING *et al.* 2010).

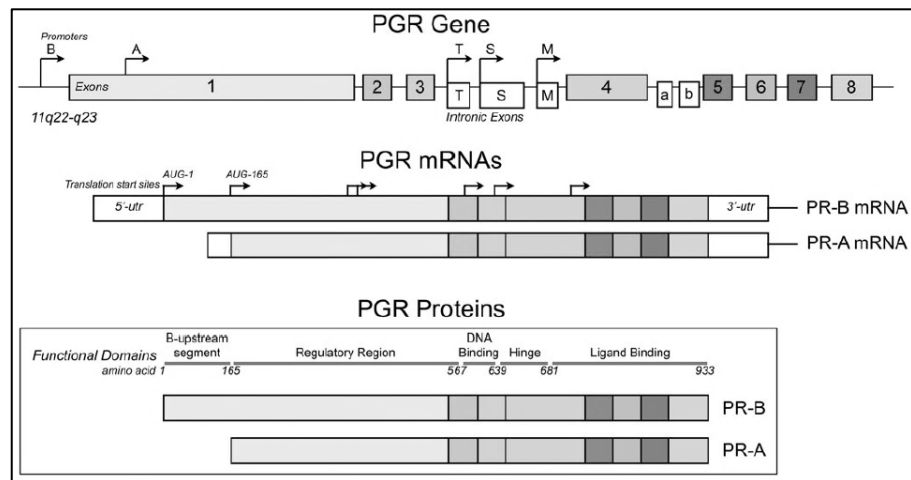
Figura 9 - Estrutura do gene CYP2C19 e localização dos SNPs *2 (rs4244285) e *17 (rs12248560).



Fonte: Adaptado de SUGIMOTO *et al.*, 2014. Os SNPs *2 (rs4244285) e *17 (rs12248560) estão destacados em círculos.

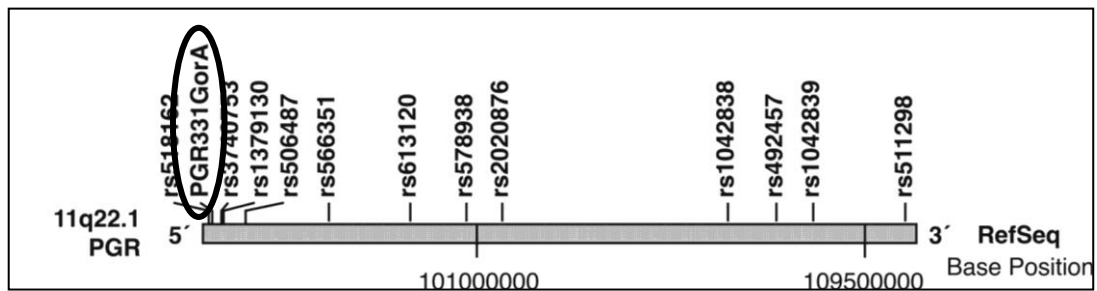
O gene *PGR*, localizado no braço longo do cromossomo 11, é responsável por codificar as duas isoformas do receptor da progesterona (PR-A e PR-B) pela transcrição de promotores alternativos (LAMP *et al.*, 2011), representados na figura 10. O polimorfismo +331C>T (rs10895068), localizado na região promotora do gene *PGR*, cria um TATA box adicional aumentando a transcrição do *PGR* e favorecendo a produção de PR-B (Figura 11) (DE VIVO *et al.*, 2002; VAN KAAM *et al.*, 2007).

Figura 10 - Isoformas do receptor da progesterona produzidos pelo gene *PGR*.



Fonte: Adaptado de PATEL *et al*, 2015. Os principais transcritos de mRNA são derivados de locais iniciais de tradução controlados pelos promotores PR-B (distal) e PR-A (proximal). Os principais produtos proteicos (em caixa) são o PR-B completo produzido a partir de PR-BmRNA e iniciado a partir do primeiro AUG, e o PR-A que é produzido a partir do mRNA de PR-A e iniciado a partir do segundo AUG. Os receptores contêm domínios funcionais típicos da família de receptores nucleares.

Figura 11 - Estrutura do gene *PGR* e localização do SNP +331C>T (rs10895068).

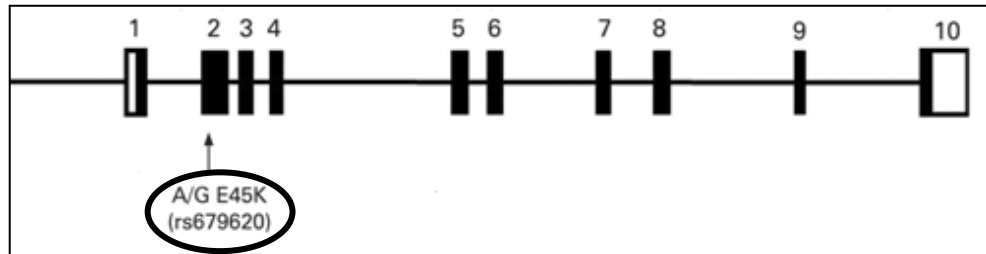


Fonte: Adaptado de GOLD *et al.*, 2004. O SNP +331C>T (rs10895068) está destacado em círculo.

O gene *MMP-3* está localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.3), contém 10 éxons, e codifica uma enzima que degrada fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos de cartilagem. Dentre os polimorfismos encontrados para esse gene se destaca o SNP 276A>G (rs679620 - E45K), localizado no éxon 2, que codifica uma variante não sinônima de Lisina-Glutamina no 45º aminoácido (em um pró-domínio de 18 a 99º aminoácidos) da MMP-3 (Figura 12). A remoção de uma porção do pró-domínio resulta em mudanças conformacionais e torna a ativação autocatalítica rápida para gerar uma enzima totalmente ativa (NAGASE *et al.*, 1990). Embora não haja evidência direta que indique o

papel funcional do 45º aminoácido, ele pode estar envolvido no processo de ativação de proteínas.

Figura 12 - Estrutura do gene *MMP-3* e localização do SNP 276A>G (rs679620).



Fonte: Adaptado de RALEIGHL, *et al.*, 2009. O SNP 276A>G (rs679620) está destacado em círculo.

Além dos efeitos que os hormônios podem causar no desenvolvimento da endometriose, a angiogênese também tem sido amplamente estudado (MACHADO *et al.*, 2008; PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016a, CARDOSO *et al.*, 2016b), visto que é um evento essencial para a implantação e manutenção dos focos de endometriose. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascularizada preexistente que leva oxigênio e nutrientes necessários para as células. É um processo que envolve várias etapas, incluindo a ativação de células endoteliais, quebra da membrana basal e degradação da matriz extracelular e migração e proliferação dessas células (FIGG e FOLKMAN, 2008; TAHERGORABI e KHAZAEI, 2012). As MMPs, grupo importante de enzimas dependentes de zinco responsáveis por essa degradação, representam um ponto importante na angiogênese (ABBAS *et al.*, 2005). Sua atividade é controlada pela regulação transcricional, pela ativação da pró-enzima e inibição por meio das TIMPs (inibidores teciduais específicos de MMPs). Um estudo investigou o modo de implantação do endométrio na cavidade abdominal, e revelaram que a degradação e reconstrução da matriz extracelular (MEC) foram os elementos centrais da implantação do endométrio (UMEZAWA *et al.*, 2012). Além disso, estudos têm demonstrado que a expressão de MMP é significativamente aumentada no endométrio ectópico, indicando que as MMPs podem participar no deslocamento do endométrio (CHEN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2010; JIAO *et al.*, 2013). Entre a família das MMPs, a MMP-3 se destacam por desempenhar um papel muito importante no desenvolvimento da endometriose.

A enzima MMP-3 também participa do processo angiogênico degradando os elementos da matriz extracelular possibilitando a migração e a formação de tubos pelas

células endoteliais (KLAGSBRUN, 1991; DICARLO *et al.*, 2009). Em 2015, Xuan e colaboradores encontraram uma maior expressão de *MMP-3* nas lesões endometrióticas quando comparado ao endométrio normal, confirmando sua importante influência na etiologia da doença (LV *et al.*, 2015).

Além disso, atualmente diversos estudos têm demonstrado a contribuição de genes envolvidos no processo angiogênico e o desenvolvimento da endometriose (SUNDQVIST *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2015; RAHMIOGLU *et al.*, 2015). Recentemente, nosso grupo publicou dois artigos referentes ao papel dos SNPs de *VEGF* e *KDR* como fatores de risco para endometriose e demonstrou que os SNPs *VEGF -2578C>A* e *-1154G>A* foram positivamente associados com a suscetibilidade à endometriose, enquanto que os SNPs *VEGF +405G>C* e *KDR 1192C>T* foram associados negativamente com a doença. Além disso, foi sugerido que existe uma interação gene-gene significativa entre *VEGF* e *KDR*, contribuindo para o entendimento da etiologia da endometriose (PERINI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2016b). A partir disso, com o intuito de continuar nessa linha de raciocínio, a presente tese foi avaliar polimorfismos do gene da *MMP-3*, visto que esta enzima possui uma grande importância no ciclo menstrual, sendo regulada pelos hormônios sexuais femininos, para o início do processo angiogênico e no desenvolvimento da endometriose (COX *et al.*, 2001; BRUNER-TRAN *et al.*, 2002; MEOLA *et al.*, 2010).

Os SNPs *PGR +331C>T*, *CYP17A1 -34A>G*, *CYP19A1 1531G>A*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17* e *MMP-3 276A>G* possuem uma frequência relativamente alta nas populações brasileira, americana e europeia (acima de 10%; unicamente o SNP *PGR +331C>T* possui uma frequência de 5 à 7%) (DE CARVALHO *et al.*, 2007; PEARCE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011; LETRA *et al.*, 2012; WIELSØE *et al.*, 2018) e podem acarretar mudanças na expressão e função da proteína, o que justifica o interesse em estudá-los (GHISARI *et al.*, 2014; DALY, 2015). Ainda assim, os dados de associação destes SNPs com a endometriose, publicados anteriormente, são controversos e escassos (KADO *et al.*, 2002; HSIEH *et al.*, 2004; HSIEH *et al.*, 2005; JUO *et al.*, 2006; DE CARVALHO *et al.*, 2007; HUR *et al.*, 2007; VAN KAAM *et al.*, 2007; ÇAYAN *et al.*, 2009; VIETRI *et al.*, 2009; BOZDAG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; LAMP *et al.*, 2011, PAINTER *et al.*, 2011; TRABERT *et al.*, 2011; PAINTER *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; CONG *et al.*, 2018; MOUSAZADEH *et al.*, 2019).

2.3.2 Associação dos SNPs dos genes *PGR*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *CYP2C19* e *MMP-3* no desenvolvimento da endometriose

Ao longo dos últimos anos, tem sido cada vez mais investigada a associação entre variantes genéticas e a suscetibilidade da endometriose (ALBERTSEN *et al.*, 2013; RAHMIOGLU *et al.*, 2014). Até o momento a literatura dispõe de 4 artigos que avaliaram a associação do SNP *PGR* +331C>T com a endometriose (VAN KAAM *et al.*, 2007; LAMP *et al.*, 2011, TRABERT *et al.*, 2011; MOUSAZADEH *et al.*, 2019), 9 do SNP *CYP17A1* -34A>G (JUO *et al.*, 2006; KADO *et al.*, 2002; HSIEH *et al.*, 2004; HSIEH *et al.*, 2005; DE CARVALHO *et al.*, 2007; VIETRI *et al.*, 2009; BOZDAG *et al.*, 2010; TRABERT *et al.*, 2011; CONG *et al.*, 2018), 4 do SNP *CYP19A1* 1531G>A (HUR *et al.*, 2007; LAMP *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014), 4 do SNP *CYP2C19**2 (ÇAYAN *et al.*, 2009; BOZDAG *et al.*, 2010; PAINTER *et al.*, 2011; PAINTER *et al.*, 2014) e 2 do SNP *CYP2C19**17 (PAINTER *et al.*, 2011; PAINTER *et al.*, 2014). Em relação ao SNP 276A>G do gene *MMP-3*, não existe nenhum estudo que avaliou esse SNP no desenvolvimento da endometriose, sendo ainda necessário sua investigação. Os dados de associações dos SNPs *PGR* +331C>T, *CYP17A1* -34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2 e *CYP2C19**17 com a endometriose estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Dados de associação dos SNPs *PGR +331C>T*, *CYP17A1 -34A>G*, *CYP19A1 1531G>A*, *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17* com a endometriose em diferentes populações

SNP	População	N	Frequência do alelo variante		Associação Endometriose	Referência
			Casos (%)	Controles (%)		
<i>PGR +331 C>T (rs10895068)</i>	Holanda	165	2,3	9,7	Proteção	Van Kaam et al., 2007
	Estônia	349	6,7	8,8	Sem associação	Lamp et al., 2011
	USA	823	5,1	4,8	Sem associação	Trabert et al., 2011
	Irã	200	1,0	1,0	Sem associação	Mousazadeh et al., 2019
<i>CYP17A1 -34 A>G (rs743572)</i>	Japão	317	42,9	39,8	Sem associação	Kado et al., 2002
	China	247	50,8	60,2	Risco	Hsieh et al., 2004
	China	227	50,8	62,9	Risco	Hsieh et al., 2005
	China	510	58,2	54,3	Sem associação	Juo et al., 2006
	Brasileira	401	37,6	42,1	Sem associação	De Carvalho et al., 2007
	Itália	190	42,3	37,2	Sem associação	Vietri et al., 2009
	Turquia	93	57,6	30,8	Sem associação	Bozdag et al., 2010
	USA	823	34,8	39,3	Sem associação	Trabert et al., 2011
<i>CYP19A1 1531 G>A (rs10046)</i>	China	291	50,7	42,2	Risco	Cong et al., 2018
	Coréia	412	55,8	55,9	Sem associação	Hur et al., 2007
	China	202	35,3	41,0	Sem associação	Yang et al., 2010
	Estônia	349	45,0	40,2	Sem associação	Lamp et al., 2011
<i>CYP2C19*2 681G>A (rs4244285)</i>	China	371	42,5	43,6	Sem associação	Wang et al., 2014
	Turquia	100	17,0	7,0	Risco	Çayan et al., 2009
	Turquia	85	2,2	0,0	Sem associação	Bozdag et al., 2010
	Austrália	7060	>5,0	>5,0	Risco	Painter et al., 2011
<i>CYP2C19*17 -806C>T (rs12248560)</i>	Austrália	3.210	17,0	13,0	Risco	Painter et al., 2014
	Austrália	7060	>5,0	>5,0	Sem associação	Painter et al., 2011
	Austrália	3.210	20,0	24,0	Proteção	Painter et al., 2014

Considerando o SNP *PGR +331C>T*, apenas um estudo realizado em mulheres holandesas observou um efeito protetor no desenvolvimento da endometriose (VAN KAAM *et al.*, 2007), enquanto os outros três estudos não encontraram associação com a doença (LAMP *et al.*, 2011, TRABERT *et al.*, 2011; MOUSAZADEH *et al.*, 2019). Entretanto, Mousazadeh e colaboradores observaram que pacientes com genótipos +331 CT apresentaram um nível de expressão mais alto da isoforma PR-B em comparação aos pacientes com genótipos +331 CC (MOUSAZADEH *et al.*, 2019).

Dentre os nove trabalhos já publicados para o SNP *CYP17A1* -34A>G, três estudos observaram uma associação positiva na presença do alelo A no desenvolvimento da endometriose (HSIEH *et al.*, 2004; HSIEH *et al.*, 2005; CONG *et al.*, 2018). Enquanto que para o SNP *CYP19A1* 1531G>A nenhum estudo encontrou associação com a doença (HUR *et al.*, 2007; LAMP *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

Em relação ao SNP 681G>A (*2) do gene *CYP2C19*, três estudos realizado na população turquesa (ÇAYAN *et al.*, 2009) e australiana (PAINTER *et al.*, 2011; PAINTER *et al.*, 2014) encontraram uma associação de risco no desenvolvimento da endometriose. E apenas um estudo realizado na Turquia não observou associação significativa com a doença (BOZDAG *et al.*, 2010). Para o SNP -806C>T (*17) desse mesmo gene, um estudo encontrou um efeito protetor na presença do alelo T (PAINTER *et al.*, 2014), e um outro trabalho não observou associação com a doença (PAINTER *et al.*, 2011).

Estudos que avaliaram a associação dos SNPs *PGR* +331C>T, *CYP17A1* -34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2 e *CYP2C19**17 com a endometriose têm produzido resultados controversos. Além disso, para o SNP *MMP-3* 276A>G não existe nenhum dado de associação com a endometriose. A distribuição dos alelos varia entre as populações, e isto é especialmente significativo em populações miscigenadas, que é o caso do Brasil. Em função desses dados inconclusivos e a importância de identificar fatores de risco no desenvolvimento da endometriose, justifica-se a realização de um estudo para avaliar o possível papel destes SNPs na suscetibilidade da doença na população brasileira.

3 JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença ginecológica de elevada frequência, afetando aproximadamente 10% das mulheres, com uma taxa de recorrência de 20-30% em até cinco anos após a cirurgia. Além disso, possui um elevado custo de diagnóstico e tratamento, podendo, na maioria dos casos, apresentar sintomas graves e incapacitantes, sendo considerado atualmente um problema de saúde pública relevante.

É sabido que os hormônios femininos desempenham um papel crucial na patogênese da endometriose. Diversos estudos têm observado diferenças significativas nos níveis de expressão de enzimas envolvidas na via estrogênica em pacientes com endometriose, tais como: *PGR*, *CYP17A1*, *CYP19A1*, *CYP2C19*, *MMP-3*, sendo considerados importantes alvos de estudos moleculares. Apesar da etiologia da endometriose ainda ser desconhecida, já é sabido que fatores genéticos podem contribuir para o fenótipo desta doença. Diante disso, variantes genéticas, como os SNPs, em genes envolvidos na via dos hormônios sexuais femininos, citadas anteriormente, podem promover alterações funcionais em suas respectivas proteínas, influenciando no desenvolvimento da endometriose.

A partir disso, com o intuito de contribuir para a identificação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença, bem como para auxiliar no diagnóstico e prognóstico da endometriose, foi realizado um estudo caso-controle para avaliar a influência de SNPs em genes envolvidos com a via dos hormônios sexuais femininos na suscetibilidade da endometriose, além de descrever o perfil epidemiológico das mulheres que sofrem com esta doença.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a influência dos SNPs *PGR* +331C>T, *CYP17A1* -34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2, *CYP2C19**17 e *MMP-3* 276A>G de genes envolvidos na via dos hormônios sexuais femininos no desenvolvimento da endometriose.

4.2 ESPECÍFICOS

Descrever as características epidemiológicas e determinar a associação com os valores prognósticos, diagnósticos e sintomas da doença;

Determinar a frequência alélica e genotípica dos SNPs *PGR* +331C>T, *CYP17A1* -34A>G, *CYP19A1* 1531G>A, *CYP2C19**2, *CYP2C19**17 e *MMP-3* 276A>G em mulheres diagnosticadas com endometriose e em mulheres com diagnóstico negativo da doença;

Avaliar a magnitude de associação dos SNPs estudados no desenvolvimento da endometriose em pacientes brasileiras;

Avaliar a influência dos SNPs estudados nos subgrupos classificados pelas variáveis clínicas e antropométrica de cada paciente;

Realizar uma revisão sistemática dos estudos de associação do genoma inteiro na suscetibilidade da endometriose.

5 ASPECTOS METODOLÓGICOS

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose”, iniciado em março de 2011, tendo sido realizado o recrutamento em três hospitais da rede pública do Rio de Janeiro (Hospital Federal dos Servidores - HFSE, Hospital Federal da Lagoa - HFL e Hospital Moncorvo Filho - HMF) e um hospital da rede pública de São Paulo (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HC-FMUSP).

Para o grupo de casos foram recrutadas mulheres de até 55 anos, com diagnóstico de endometriose por laparoscopia, laparotomia ou RM. Enquanto que, para o grupo controle foram recrutadas mulheres com até 55 anos, submetidas a procedimentos cirúrgicos ginecológicos, como por exemplo, laqueadura tubária, histerectomia, retirada de mioma, cistos no ovário ou hidrosalpinge e que apresentaram diagnóstico negativo para endometriose.

Após a aplicação do questionário sócio-demográfico e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi efetuada uma coleta de sangue, para posterior extração do DNA (Kit DNA Purification from Blood or Body Fluids - QIAGEN) e análise dos SNPs dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real utilizando sondas *Taqman* validadas e adquiridas da empresa Applied Biosystems. A tabela 2 resume as características e o conjunto de sondas utilizadas para a análise de cada um dos SNPs estudados.

Tabela 2 - Características dos SNPs estudados e das sondas utilizadas para cada análise.

Gene	Alelo	ID SNP	Substituição de nucleotídeo	Região	Código da Sonda	Sonda
<i>PGR</i>	<i>T</i>	rs10895068	+331C>T	5'UTR	C__27858738_10	ACGGCAATTTAGTGACACGCGGC TC[C/T]TTTATCTCCCGACTTTTTTC TCTGGC
<i>CYP17A1</i>	<i>G</i>	rs743572	-34A>G	5'UTR	C__2852784_30	GGTGCCGGCAGGCAAGATAGAC AGC[A/G]GTGGAGTAGAAGAGCT GTGGCAACT
<i>CYP19A1</i>	<i>A</i>	rs10046	1531G>A	3'UTR	C__8234731_30	CTACTGATGAGAAATGCTCCAGA GT[A/G]GGTACTGACCAGCCTTCT CTAGTGT
<i>CYP2C19</i>	*2	rs4244285	681G>A	Éxon 5	C_25986767_70	TTCCCACTATCATTGATTATTCC C[A/G]GGAACCCATAACAAATTA CTAAAA
	*17	rs12248560	-806 C>T	RP	C_469857_10	AAATTTGTGTCCTTCTGTTCTCAAA G[C/T]ATCTCTGATGTAAGAGATA ATGCGC
<i>MMP-3</i>	<i>G</i>	rs679620	276A>G	Éxon 2	C__3047717_1_	CTAACAAACTGTTTCACATCTTTT T[G/A]GAGGTCGTAGTAGTTTTCT AGATATAGATAT

5.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o cálculo do tamanho amostral deste estudo foi utilizando o programa Epi Info 7, versão 7.1.3. (<http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>) para detectar uma diferença entre os grupos caso e controle, assumindo um poder de 0,8 e 5% de erro do tipo I.

As variáveis contínuas do estudo foram apresentadas como média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças entre as médias foram avaliadas utilizando o teste *t* de Student, enquanto que os dados categóricos foram expressos em porcentagem e avaliados pelo teste Qui-quadrado de Person (χ^2) ou teste exato de Fisher, quando necessário.

A frequência alélica e genotípica dos SNPs dos genes em estudo foi determinada por contagem direta dos alelos, e em seguida foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). As frequências alélicas e genotípicas entre os grupos estudados, foram comparadas pelo teste χ^2 ou, quando for o caso, o teste exato de Fisher.

A magnitude de associação entre a presença dos SNPs e o desenvolvimento da endometriose, bem como a presença dos sintomas, para classificação e estadiamento da doença, foi avaliada a partir de razões de chance (OR) estimadas, com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e com ajuste para possíveis fatores de confusão, utilizando modelos de regressão logística binária.

Um modelo de regressão logística multivariada foi utilizado a partir de razões de chance (OR) estimadas, com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) para avaliar a magnitude de associação dos SNPs dos genes em estudo e a endometriose, além de avaliar a influência de cada variável em estudo. Para a construção do modelo final foi considerada a importância biológica de cada variável e o grau de significância estatística na análise univariada, considerando um p-valor de entrada no modelo de 0,20 e um P-valor de saída do modelo de 0,05, para controlar os possíveis fatores de confundimento.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS, versão 20.0 e um valor de P menor que 0,05 será considerado estatisticamente significativo.

Além disso, os aspectos metodológicos específicos para cumprir cada objetivo específico encontram-se integralmente descritos nos artigos apresentados na seção 7 desta tese.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os aspectos éticos e legais referentes às fases do projeto foram respeitados de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, revista na Resolução CNS/MS nº 466, de 12 de dezembro de 2012, que contém diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Assim, todas as mulheres convidadas a participar do estudo receberam o TCLE e foram orientadas a lê-lo cuidadosamente e a inquirir a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto (ANEXOS A e B). As voluntárias que concordaram em assinar o TCLE receberam uma cópia original deste documento assinada pelo pesquisador principal (ANEXO C). O projeto original foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HFSE (Nº 000.414/2011) (ANEXO D), do HC-FMUSP (Nº09010/2011) (ANEXO E) e do HMF (CAAE: 45941715.5.0000.5275) (ANEXO F). Todas as informações pessoais foram mantidas em sigilo e foram utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo.

7 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS:

7.1 PRIMEIRO ARTIGO DA TESE

Epidemiological profile of Brazilian women with endometriosis: a retrospective descriptive study (submetido na revista *Women & Health*, em 17/08/2019)

Neste estudo foi possível descrever as características epidemiológicas de 237 mulheres com endometriose recrutadas em dois hospitais públicos brasileiros (HFSE e HMF). As mulheres com ciclo menstrual irregular foram mais propensas a ter dismenorreia (OR = 2,22; 95% IC = 1,18-4,42) e dor pélvica crônica (OR = 1,79; 95% IC = 1,07-3,01). Pacientes com IMC acima de 25 kg/m² (OR = 1,97; 95% IC = 1,10-3,53) e que ingeriam bebida alcoólica (OR = 2,13; 95% IC = 1,20-3,82) eram mais afetadas pela dispareunia. No entanto, mulheres com SUP foram menos afetadas por dispareunia (OR = 0,25; 95% IC = 0,11-0,57). As queixas intestinais cíclicas foram associadas positivamente com a presença de focos endometrióticos no reto-sigmóide (OR = 3,78; 95% IC = 1,95-7,33), endometriose intestinal (OR = 2,96; 95% IC = 1,31-6,65), com EPI (OR = 2,58; 95% IC = 1,08-6,11) e estadiamento III-IV (OR = 2,75; 95% IC = 1,31-5,76). Mulheres entre 30 e 39 anos foram mais propensas a serem inférteis do que aquelas com menos de 29 anos (OR = 2,72; 95% IC = 1,02-7,24). Além disso, mulheres cujas tubas uterinas foram afetadas pela endometriose apresentaram maior probabilidade de ter infertilidade (OR = 2,91; 95% IC = 1,18-7,17). As pacientes diagnosticadas pelo método cirúrgico foram significativamente mais velhas (idade média 36,9 ± 7,0 anos; P = 0,005), foram mais propensas a estabelecer união estável/casamento (P = 0,01) e tinham uma paridade mais baixa (P = 0,02) do que as diagnosticadas por RNM. Por fim, as mulheres com EPI apresentaram maior nível de escolaridade (P = 0,02) e maior probabilidade de não fumarem (P = 0,03) do que as que não têm EPI. Foi observado também que pacientes em estágio III-IV eram mais propensos a se casarem (P = 0,049), praticar alguma atividade física regular (P = 0,01) do que aquelas com endometriose em estágio I-II. Em conclusão, todos os sintomas da endometriose, exceto as queixas urinárias cíclicas, o diagnóstico por cirurgia, EPI e os estágios III-IV da endometriose, foram associados a variáveis sociodemográficas ou clínicas/menstruais.

**Epidemiological profile of Brazilian women with endometriosis: a retrospective
descriptive study**

Jéssica V. Cardoso, M.Sc.^{a,b}, Daniel E. Machado, Ph.D.^b, Mayara C. Da Silva^{a,b}, Plínio T. Berardo, Ph.D.^{c,d}, Renato Ferrari, Ph.D.^e, Maurício S. Abrão, Ph.D.^{f,g} and Jamila A. Perini, Ph.D.^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^b Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Brazil;

^c Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^d Departamento de Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^e Instituto de Ginecologia, Hospital Moncorvo Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^f Seção de Endometriose, Divisão de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

^g Divisão de Ginecologia, Beneficência Portuguesa de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding Author

Jamila A. Perini, PhD. Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste - UEZO, Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas. Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1.203, Campo Grande, Zip code 23070-200, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 2332-7535. E-mail address: jamilaperini@yahoo.com.br.

Abstract

This study described the characteristics of Brazilian endometriosis women and determined the relationship between the characteristics of the disease. Women were recruited at two Brazilian public hospitals (N=237). Associations between subgroups of patients and epidemiological features were estimated by odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI 95%), using multivariate logistic regression models. Most women (87%) had ovarian endometrioma and/or deeply infiltrating endometriosis (DIE), 59% were stage III-IV and 48% had 2 to 4 affected organs. Dysmenorrhea (OR = 2.22; 95% CI, 1.18-4.42) and pelvic pain (OR = 1.79; 95% CI, 1.07-3.01) were associated with irregular menstrual cycle; dyspareunia with BMI >25kg/m² (OR = 1.97; 95% CI, 1.10-3.53), alcohol consumption (OR = 2.13; 95% CI 1.20-3.82) and superficial endometriosis (OR = 0.25; 95% CI, 0.11-0.57); infertility with 30 – 39 age (OR = 2.72; 95% CI, 1.02-7.24); dysmenorrhea, cyclical intestinal complaints and infertility with endometriosis loci; DIE and stage III-IV with cyclical intestinal complaints; DIE with education level and smoking status; stage III-IV with marital status and physical activity; surgery diagnosis were associated with age, marital status and parity. Our data supply information about the profile of Brazilian women with endometriosis, with the goal of assisting in diagnosis and treatment planning.

Keywords: Brazilian, Endometriosis, Epidemiology, Prognosis, Symptoms.

Introduction

Endometriosis is a gynecological disease defined by presence of endometrial tissue outside the uterus (Benagiano et al. 2014), associated with different symptoms, such as dysmenorrhea, chronic pelvic pain, dyspareunia, infertility and intestinal and urinary complaints cyclical as its onset (Fuldeore and Soliman, 2017). The prevalence of the disease is not clearly established yet, but it is estimated to affect approximately 10% of the premenopausal women (Eisenberg et al. 2018), and 35 -50% of infertile women (Buck et al. 2011; Acién and Velasco, 2013). Endometriosis is a disease which entails a significant burden on the quality of life of women and healthcare systems, mainly due to the incapacitating symptoms of pain, the presence of infertility, the delay and the high cost of diagnosis and treatment (Selçuk and Bozdağ, 2013; Hughes et al. 2015; Facchin et al. 2015; Koltermann et al. 2016).

The etiology of endometriosis remains unknown, although the most accepted theory regarding its development is the retrograde menstruation, which is an outflow of the endometrial lining through the patent uterine tubes into the pelvic cavity, resulting in the seeding of endometrial tissue in ectopic sites (Sampson, 1927). However, retrograde menstruation is also observed in normal women, suggesting that other factors should be involved in the development and the maintenance of the ectopic implants, as hormonal (Ferrero et al. 2014), inflammatory and immunologic (Ricchio et al. 2018). There are strong evidences of a genetic predisposition (Perini et al. 2014; Rahmioglu et al. 2014; Cardoso et al. 2017a, 2017b, 2017c) nevertheless the development of endometriosis is associated with environmental factors (Chapron et al. 2016).

Studies have shown that BMI (Chapron et al. 2016; Shahbazi and Shahrabi-Farahani, 2016), smoking (Calhaz-Jorge et al. 2004) and physical activity (Heilier et al. 2007) have an inverse association with endometriosis, although the mechanisms of these association remains unclear. Other factors have also been associated with endometriosis, such as early age at menarche (Nnoaham et al. 2012), short menstrual cycle length (Matalliotakis et al. 2008) and infertility (Prescott et al. 2016), all associated with an increased risk, while parity (Peterson et al. 2013) and oral contraceptive use (Saha et al. 2017) are associated with a decreased risk. Despite some studies have addressed the association between endometriosis and demographic factors, personal habits, menstrual and reproductive factors, the pathophysiology of disease remains an enigma and the appropriate counseling of patients regarding prognosis is still challenging (Chapron et al. 2016; Sinaii et al. 2008; Liu et al. 2016; von Theobald et al. 2016). In this context, the aim of this study was to describe on the characteristics of Brazilian

endometriosis patients and to determine the relationship between prognostic values, diagnosis and symptoms of disease and their epidemiological features.

Materials and Methods

Study design

This hospital-based retrospective descriptive study included 237 women recruited, between 2011 and 2017, from two Brazilian public hospitals. All followed procedures were approved by the Brazilian Ethic Committees of the *Hospital Federal dos Servidores do Estado* (414/2011) and of the *Hospital Moncorvo Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro* (1.244.294/2015). The patients participated in a face-to-face interview, then provided written informed consent to allow their medical data to be collected, analyzed, and shared, and completed a demographic questionnaire during appointments.

Patients were eligible if they showed histologically confirmed endometriosis lesions or if they showed images of endometrial lesions at magnetic resonance imaging (MRI). Indications for performing surgery were: infertility without access to assisted reproduction techniques, pain refractory to clinical treatment, functional impairment of organs such as large bowel and/or urinary tract or bulky and/or suspected endometriomas. Women who have not undergone surgery met the clinical criteria for the diagnosis and also presented an endometriosis indicative MRI. We considered for this study those patients that presented foci of bleeding together with fibrosis characterizing infiltrative endometriosis. In addition, patients with only suspected endometrioma by MRI yet with no associated infiltrative lesions were not included. According to the American Fertility Society Score (The American Fertility Society, 1997), patients with endometriosis diagnosed by surgery were divided in stages I–II and stages III–IV (The American Fertility Society, 1997). Endometriotic lesions were classified into three groups: superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA) or deeply infiltrating endometriosis (DIE) (Nisolle and Donnez, 1997). Patients were excluded in the event of pregnancy or if surgical findings showed suspicion or evidence of malignancy.

Objectives and assessments

The primary objective of this study was to evaluate the demographic, clinical, lifestyle, and environmental factors associated with endometriosis. And the secondary objective was to identify the differences in characteristics evaluated in this study among different subgroups (surgical diagnosis and MRI diagnosis, non-DIE and DIE; I–II and III–IV stages; presence and absence of the symptoms).

The following patients' characteristics were collected for this study: age, race, BMI, marital status, education level, contraceptive use, personal habits (smoking, alcohol consumption, physical activity), family history of endometriosis, menstrual characteristics (age at menarche, cycle regularity and flow intensity), reproductive history (parity, infertility, spontaneous abortion), symptoms of endometriosis (dysmenorrhea, pelvic pain, dyspareunia, intestinal and urinary cyclical complaints), age at endometriosis diagnosis, diagnosis method, hormonal treatment for endometriosis, endometriosis staging and classification and ectopic loci affected by the disease.

Body mass index (BMI) was categorized according to standard WHO cut-off points: underweight (BMI < 18.5kg/m²), normal weight (18.5 - 24.9kg/m²), overweight (25 - 29.9kg/m²), obese (30 - 39.9kg/m²) or morbidly obese (\geq 40kg/m²) (WHO Expert Committee, 1995). The personal habits were self-reported, and we considered at least one year of practice/consumption. Menstrual characteristics were also self-reported. Only severe and incapacitating cyclic and acyclic pains were considered as symptoms of endometriosis, as described in our previous study (Cardoso et al. 2017a, 2017b, 2017c). Infertility was defined as a couple not being able to conceive after 12 consecutive months of regular, contraceptive-free intercourse (primary or secondary) (Cardoso et al. 2017a, 2017b, 2017c).

Statistical analysis

A descriptive study was conducted, presenting relative frequencies for each categorical variable. Women were categorized according prognostic values, type of diagnosis, and presence of clinical symptoms, and evaluated for their association with the personal and clinical features.

Student's *t*-test was used to compare continuous variables between the studied groups, and results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test, when applicable, were used to compare the differences among the categorical variables. Multivariate logistic regression analyses were performed to identify possible confounding factors in the associations between the variables and endometriosis or between the variables and endometriosis features, which were estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). For the construction of the final regression model, we considered the biological significance of each variable and the degree of statistical significance in the univariate analysis, considering a *P*-value input of 0.20 and a *P*-value output of 0.05. Differences were considered statistically significant when *P* < 0.05. All

analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), version 20.0.

Results

The sociodemographic characteristics of the 237 endometriosis women are summarized in Table 1. The mean age was 36.1 ± 7.2 years, with approximately 78% of the women over 30 years of age. Approximately 57% of the patients were married and in the self-reported skin color variable, the highest proportion (~69%) was intermediate and white. Most participants had at least finished high school (82.7%) and had a mean BMI of 26.6 ± 5.4 kg/m², with more than half of them (~66%) having a BMI between 18.5 and 29.9 kg/m². In addition, most of them practiced some regular physical activity (57.4%) and approximately 80% were never smokers, however almost 56% had some regular alcohol consumption. Regarding the reproductive history, 32.2% of the patients never gave birth and 19.9% had a spontaneous abortion. Besides, 87.7% of them uses oral contraception, 28.3% uses injectable contraception and 8% uses DIU. Furthermore, 19.8% of them had history of endometriosis in first-degree relatives. [Table 1 near here]

Regarding the menstrual characteristics, the mean age at menarche was 12.5 ± 1.7 years, with 43.5% of the patients reaching menarche between 12-13 years. About 50% of the patients had an irregular menstrual cycle and approximately 61% reported increased menstrual flow intensity. The clinical characteristics of the study population are listed in Table 2. Around 33.3% of the patients underwent previous hormonal treatment for endometriosis and 46.4% had endometriosis diagnosed by laparoscopy, of which 55.7% were stage III-IV. [Table 2 near here]

Most of the patients were reported to have OMA and/or DIE (86.5%), with 15 (6.3%) patients having only SUP, 55 (23.2%) only OMA and 56 (23.6%) only DIE, 5 (2.1%) women had SUP and OMA, 10 (4.2%) had SUP and DIE and 72 (30.4%) had OMA and DIE. In addition, 21 (8.9%) patients with SUP and OMA were associated with DIE (Figure 1). Under these circumstances, 104 women had only one affected loci (43.9%), 114 had 2 to 4 affected loci (48.1%) and 16 women had more than 4 affected loci, with ovary being the most prevalent loci, followed by the uterosacral ligament and by the rectosigmoid. [Figure 1 near here]

The most common symptom was dysmenorrhea, followed by deep dyspareunia and non-cyclic chronic pelvic pain (Table 2), with most patients presenting at least three symptoms. Almost 38.4% the women with endometriosis reported infertility and, considering

the number of painful symptoms by individual patients, 32 (13.5%) women had only dysmenorrhea, 20 (8.4%) only deep dyspareunia and 3 (1.3%) only chronic pelvic pain, 40 (16.9%) women had dysmenorrhea and dyspareunia, 33 (13.9%) women had dysmenorrhea and chronic pelvic pain and 2 (0.8%) women had dyspareunia and chronic pelvic pain. Finally, 86 (36.3%) patients had both dysmenorrhea, dyspareunia and chronic pelvic pain (Figure 2). [Figure 2 near here]

Figure 3 shows a comparison between asymptomatic and symptomatic women for dysmenorrhea (A-B), non-cyclic chronic pelvic pain (C), deep dyspareunia (D-F), cyclical intestinal complaints (G-J) and infertility (K-L), regarding the demographic, clinical and menstrual characteristics of the study population. We found that patients with irregular menstrual cycle were more likely to have dysmenorrhea (OR = 2.22; 95% CI, 1.18 - 4.42) and chronic pelvic pain (OR = 1.79; 95% CI, 1.07-3.01). Women with uterosacral ligament endometriosis were more affected by dysmenorrhea (OR = 2.8; 95% CI, 3.14 – 7.52). We also observed that patients with BMI higher than 25 kg/m² (OR = 1.97; 95% CI, 1.10 - 3.53), and who had any alcohol consumption (OR = 2.13; 95% CI, 1.20 - 3.82) were more affected by dyspareunia. However, woman with superficial endometriosis were less affected by dyspareunia (OR = 0.25; 95% CI, 0.11 - 0.57). The cyclical intestinal complaints were positively associated with retosigmoid (OR = 3.78; 95% CI, 1.95 - 7.33) and intestine endometriosis (OR = 2.96; 95% CI, 1.31 – 6.65), and with DIE (OR = 2.58; 95% CI, 1.08– 6.11) and stage III/IV endometriosis (OR = 2.75; 95% CI, 1.31-5.76). Finally, we found that women between 30 – 39 years old were more likely to be infertile than those younger than 29 years (OR = 2.72; 95% CI, 1.02 – 7.24). We also observed that women whose uterine tubes were affected by endometriosis were more likely to have infertility (OR = 2.91; 95% CI, 1.18 - 7.17). [Figure 3 near here]

Table 3 shows the demographic and clinical differences between cases diagnosed by surgery and image, DIE and non-DIE cases and between endometriosis stages I-II and III-IV. We found that the patients diagnosed by surgery were significantly older (mean age 36.9 ± 7.0 years; *P* = 0.005), were more likely to be married (*P* = 0.01) and had a lower parity (*P* = 0.02) than those diagnosed by image. Women with DIE showed a higher education level (*P* = 0.02) and were more likely to be never smokers (*P* = 0.03) than the ones without DIE. We observed that stage III-IV patients were more likely to be married (*P* = 0.049), to practice some regular physical activity (*P* = 0.01) than the ones with endometriosis stage I-II. [Table 3 near here]

The mean time between the first endometriosis symptoms and diagnosis was 4.5 ± 6.5 years, with a significant (*P* < 0.05) difference between endometriosis stages I/II and III/IV

(3.3 ± 4.1 and 5.3 ± 7.5 years) and between DIE versus non-DIE patients (3.8 ± 5.4 and 5.2 ± 7.0 years). However, no statistical differences were found between patients with diagnosis confirmed by surgery or by image methods (data not shown).

Discussion

In the present descriptive study, we observed that most of the women with endometriosis were of reproductive age, had normal weight and presented high frequency of all clinical symptoms of the disease. Considering the number of gynecologic pain symptoms, a third of them reported having dysmenorrhea, pelvic pain, and dyspareunia, and a quarter reported to have dysmenorrhea and dyspareunia. Infertility was observed among more than half of women. Dysmenorrhea and non-cyclic chronic pelvic pain were associated with irregular menstrual cycle; deep dyspareunia with BMI, alcohol consumption and superficial endometriosis; DIE with education level and smoking status; DIE and stage III-IV with cyclical intestinal complaints and a longer time of diagnosis; infertility with age; dysmenorrhea, cyclical intestinal complaints and infertility with endometriosis loci. Women with advanced stages of endometriosis were also more likely to be married and to practice some physical activity. In addition, women diagnosed by image presented a significantly younger age and were more likely to be single and to have high parity, compared to those diagnosed by surgery.

This is the first study, to our knowledge, which determined the relationship between prognostic values, diagnosis and symptoms of disease and their epidemiological features. A larger sample size would be required to detect more associations and provide more confidence in the findings. Although the recruitment time in this study was 6 years and it was conducted in two hospitals, the diagnosis for endometriosis is very difficult and therefore long (Staal et al. 2016). However, the diagnostic time of our study was lower (4.5 years) than those found elsewhere (~8 years) (Nnoaham et al. 2012; Staal et al. 2016; Moradi et al. 2014), since our two recruitment hospitals are specialized centers for diagnosis and treatment of endometriosis, which able to perform a quick and accurate diagnosis of the disease. Additionally, as this is an observational study, it is possible that there are still unmeasured variables, which forbids the complete exclusion of possible residual confounding. Nevertheless, this bias is minimal given the adjustment by lots of priori confounding factors. A referral bias has also to be raised: Patients included in this study are treated in two reference institutions for endometriosis. Those patients may have more severe symptomatology as they were probably referred to these centers, biasing the results.

Endometriosis is usually present in women of reproductive age (Benagiano et al. 2014; Eisenberg et al. 2018; Chapron et al. 2016; von Theobald et al. 2016), according to the mean age (36 years) described in the present study. The endometriosis risk associated to a lower BMI has been described but remains an enigma (Eisenberg et al. 2018; Chapron et al. 2016; Shahbazi and Shahrabi-Farahani, 2016; Backonja et al. 2017). Our findings agree with earlier studies linking an inverse association between endometriosis and BMI (Eisenberg et al. 2018; Perini et al. 2014; Chapron et al. 2016; Shahbazi and Shahrabi-Farahani, 2016; Backonja et al. 2017; Shah et al. 2013; Liu Y and Zhang, 2017). However, the biosynthesis of estrogen, an important hormone that contributes to endometriosis progression, come primarily in the ovaries, but also occurs in the adipose tissue and subcutaneous fat in the body (Bulun et al. 2012). Thus, biologically, the low BMI cannot be explained in women with endometriosis. Probably, there is a diagnosis bias, because obese women with pelvic pain may be less submitted to surgical intervention, reducing the laparoscopic diagnosis of endometriosis. In addition, misclassification of BMI may occur for studies with a self-reported height and weight (Liu and Zhang, 2017). Therefore, the relationship between endometriosis and BMI, and the genetic and molecular effects upon body weight will still need to be elucidated. According to our results, positive associations about family history of endometriosis have been suggested in several studies (Matalliotakis et al. 2008; Kashima et al. 2004; Flores et al. 2008; Hansen and Eyster, 2010; Audebert et al. 2015), including higher endometriosis severity for patients with a positive family history (Nouri et al. 2010; Chapron et al. 2011).

Endometriosis patients reported to be married and had higher level of education, corroborating with previous studies (Chapron et al. 2016; Liu et al. 2016; Moradi et al. 2014; Bellelis et al. 2010; Fourquet et al. 2010). Nowadays, women use contraceptives more often and for a longer period, therefore only discover the presence of the disease when they decide to get pregnant (Hruska et al. 2000; Hemmings et al. 2004). We also observed that most women used contraceptives (Chapron et al. 2016; Peterson et al. 2013; Santulli et al. 2016), had menarche age of 12 years old and high flow intensity, and half of them had irregular menstrual cycle, in agreement with recent studies (Chapron et al. 2016; Flores et al. 2008; Fourquet et al. 2010; Farland et al. 2017).

Regarding lifestyle features, we found that patients had the habit of practicing physical activity and drinking alcohol, also most of them never smoked. Some studies have reported that women with endometriosis drink more alcohol (Heilier et al. 2007; Trabert et al. 2011; Parazzini et al. 2013; Upson et al. 2013), perform more physical activities (Farland et al.

2017) and usually don't smoke (Chapron et al. 2016; Backonja et al. 2017), in accordance with our findings.

More than one third of the patients had all three symptoms of gynecological pain combined, according to a cohort of 1000 women from Britain, Ireland, and the United States, whose frequency of dysmenorrhea, dyspareunia and chronic pelvic pain combined was 34.4% (Sinaii et al. 2008). Women with irregular menstrual cycle were positively associated with dysmenorrhea and chronic pelvic pain, consistent with Nohara et al. (Nohara et al. 2011). Women with SUP had decreased risk of dyspareunia, according to Chapron et al. (Chapron et al. 2016), since the peritoneum area is less likely to be struck during intercourse. Endometriosis may cause dyspareunia by tension on the infiltrated uterosacral ligament during intercourse (Fauconnier et al. 2002), since the distance between ectopic endometrial growths and nerve fibers in women with this symptom is shortened (Tulandi et al. 2001). We have also observed that intestinal symptoms are positively associated with endometriosis in the rectosigmoid and intestine loci, DIE and the advanced stages of the disease. It is to be considered the pain to evacuate may be due to infiltrative lesions (Pandian et al. 2008). Finally, infertile women had almost a 3-fold increase in the risk of endometriotic lesions in uterine tubes. Previous reports have described that uterine tube's diseases accounts for 25-35% of all female primary infertility cases and can be associated with endometriosis (Pandian et al. 2008; Johnson et al. 2010; Briceag et al. 2015; Pereira and Kligman, 2016). In addition, women between 30-39 years were associated with increased risk of infertility. Briceag et al. (Briceag et al. 2015) showed that the risk of having a diagnosis of tubal factor infertility at 35-39 years was 2 times higher than those under 30 years.

As expected, most patients were diagnosed by laparoscopy, in agreement with recent publications (Fuldeore and Soliman, 2017; Chapron et al. 2016; Sinaii et al. 2008), since it is the gold standard for endometriosis diagnosis (ARSM). Currently, laparoscopy treatment is recommended preferably in cases of infertility, untreatable pain and/or those with significant involvement of the intestine or urinary tract with risk of functional impairment (Singh and Suen, 2017; Kho et al. 2018). In our study, 37% of women were diagnosed by MRI, which have been described as an accurate method for the detection of deep endometriosis by their high specificity and sensibility (Bianek-Bodzak et al. 2013; Ma et al. 2015; Barcellos et al. 2016). Nevertheless, SUP cases, mainly, can be underdiagnosed (Bianek-Bodzak et al. 2013). The present study showed that most sociodemographic and clinical variables had similar frequencies between women who underwent surgery versus imaging diagnosis; however, only those diagnosed by image were younger, had greater parity and were single. We hypothesized

that older women perform surgical diagnosis to treat a possible infertility, which also explains the fact that they are, for the most part, married and trying to conceive a child.

In summary, all of endometriosis symptoms, except cyclical urinary complaints, as well as diagnosis by surgery, and DIE and advanced stages of endometriosis, were associated with either sociodemographic or clinical/menstrual variables. Despite of not knowing for sure that these associations are causal, the epidemiological analysis of data from these patients represents an important tool in the identification of endometriosis etiology. By understanding the epidemiological characteristics associated with the disease, it would be possible to determined guideline to improve diagnosis, prognosis and treatment of endometriosis.

Acknowledgments

The authors thank all the staff of the two recruitment hospitals (HFSE and HMF) for their technical assistance and who have contributed to realization this study.

Funding

This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ under Grant E-26/203.248/2016; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES under Grant 88881.189208/2018-01.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- The American Fertility Society. 1997. The American Fertility Society: revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis. *Fertility and Sterility*. 67:817–821.
- Acién, P. and I. Velasco. 2013. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstetrics and gynecology*. 2013:242149 doi: 10.1155/2013/242149.
- Audebert, A., L. Lecointre, K. Afors, A. Koch, A. Wattiez, and C. Akladios. 2015. Adolescent Endometriosis: Report of a Series of 55 Cases With a Focus on Clinical Presentation and Long-Term Issues. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. (5):834-40. doi: 10.1016/j.jmig.2015.04.001.

- Backonja, U., M.L. Hediger, Z. Chen, D.R. Lauver, L. Sun, C.M. Peterson, and L.G.M. Buck. 2017. Beyond Body Mass Index: Using Anthropometric Measures and Body Composition Indicators to Assess Odds of an Endometriosis Diagnosis. *Journal of Women's Health (Larchmt)*. (9):941-950. doi: 10.1089/jwh.2016.6128.
- Barcellos, M. B., B. Lasmar, and R. Lasmar. 2016. Agreement between the preoperative findings and the operative diagnosis in patients with deep endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Apr;293(4):845-50. doi: 10.1007/s00404-015-3892-x.
- Bellelis, P., J. A. Jr. Dias., S. Podgaec, M. Gonzales, E. C. Baracat, and M. S. Abrão,. 2010. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis: a case series. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 56(4):467-71.
- Benagiano, G., I. Brosens, and D. 2014. The history of endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*. 78(1):1-9. doi: 10.1159/000358919.
- Bianek-Bodzak, A., E. Szurowska, S. Sawicki, and M. Liro. 2013. The importance and perspective of magnetic resonance imaging in the evaluation of endometriosis. *BioMed Research International*. 436589. doi: 10.1155/2013/436589.
- Briceag, I., A. Costache, V. L. Purcarea, R. Cergan, M. Dumitru, I. Briceag, M. Sajin, and A. T. Ispas. 2015. Fallopian tubes--literature review of anatomy and etiology in female infertility. *Journal of Medicine and Life*.8(2):129-31.
- Buck, L. G. M., M. L. Hediger, C. M. Peterson, M. Croughan, R. Sundaram, J. Stanford, Z. Chen, V. Y. Fujimoto, M. W. Varner, A. Trumble et al. 2011. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertility and sterility*. Aug;96(2):360-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.087.
- Bulun, S. E., D. Chen, I. Moy, D. C. Brooks, and H. Zhao. 2012. Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. Feb;23(2):83-9. doi: 10.1016/j.tem.2011.10.003.
- Calhaz-Jorge, C., B. W. Mol, J. Nunes, and A. P. Costa. 2004. Clinical predictive factors for endometriosis in a Portuguese infertile population. *Human Reproduction (Oxford, England)*. Sep;19(9):2126-31. doi: 10.1093/humrep/deh374
- Cardoso, J. V., M. S. Abrão, R. Vianna-Jorge, R. Ferrari, P. T. Berardo, D. E. Machado, and J. A. Perini . 2017a. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 209:25-33.
- Cardoso, J. V., D. E. Machado, R. Ferrari, M. C. D. Silva, P. T. Berardo, and J. A. Perini, 2017b. Combined Effect of the PGR +331C>T, CYP17A1 -34A>G and CYP19A1

- 1531G> A Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis. *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*. 39(6):273-281.
- Cardoso, J. V., M. S. Abrão, P. T. Berardo, R. Ferrari, L. E. Nasciutti, D. E. Machado, and J. A. Perini. 2017c. Role of cytochrome P450 2C19 polymorphisms and body mass index in endometriosis: A case-control study. *European Journal Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*.219:119-23. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.10.027>
- Chapron, C., M. C. Lafay-Pillet, E. Monceau, B. Borghese, C. Ngô, C. Souza, and D. Ziegler. 2011. Questioning patients about their adolescent history can identify markers associated with deep infiltrating endometriosis. *Fertility and sterility*. 95(3), 877-881.
- Chapron, C., L. H. Lang, J. H. Leng, Y. Zhou, X. Zhang, M. Xue, A. Popov, V. Romanov, P. Maisonobe and P. Cabri. 2016. Factors and regional differences associated with endometriosis: a multi-country, case-control study. *Advances in Therapy*. 33(8):1385-407. doi: 10.1007/s12325-016-0366-x
- Eisenberg, V. H., C. Weil, G. Chodick, and V. Shalev. 2018. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *An international journal of obstetrics and gynecology*. 125(1):55-62. doi: 10.1111/1471-0528.14711.
- Facchin, F., G. Barbara, E. Saita, P. Mosconi, A. Roberto, L. Fedele, and P. Vercellini. 2015. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *Journal of Psychosomatic Obstetrics Gynecology*. 36(4):135-41. doi: 10.3109/0167482X.2015.1074173.
- Farland, L. V., S. A. Missmer, A. Bijon, G. Gusto, A. Gelot, F. Clavel-Chapelon, S. Mesrine, M. C. Boutron-Ruault, and M. Kvaskoff. 2017. Associations among body size across the life course, adult height and endometriosis. *Human Reproduction*. 32(8):1732-1742. doi: 10.1093/humrep/dex207.
- Fauconnier, A., C. Chapron, J. B. Dubuisson, M. Vieira, B. Dousset, and G. Bréart. 2002. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertility and Sterility*. 78:719–726.
- Ferrero, S., V. Remorgida, C. Maganza, P. L. Venturini, S. Salvatore, E. Papaleo, M. Candiani, and U. L. R. M Maggiore. 2014. Aromatase and endometriosis: estrogens play a role. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Genoa, p.1317-23. <http://doi.org/10.1111/nyas.12411>.

- Flores, I., S. Abreu, S. Abac, J. Fourquet, J. Laboy, and C. Ríos-Bedoya. 2008. Self-reported prevalence of endometriosis and its symptoms among Puerto Rican women. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. 100(3):257-61. doi:10.1016/j.ijgo.2007.08.010
- Fourquet, J., X. Gao, D. Zavala, J. Orengo, S. Abac, A. Ruiz, J. Laboy, and I. Flores. 2011. Patients' report on how endometriosis affects health, work, and daily life. *Fertility and Sterility*. 93(7): 2424–2428. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.017.
- Fuldeore, M. J., and A. M. Soliman. 2017. Prevalence and Symptomatic Burden of Diagnosed Endometriosis in the United States: National Estimates from a Cross-Sectional Survey of 59,411 Women. *Gynecologic and obstetric investigation*. 82(5):453-461. doi: 10.1159/000452660.
- Hansen, K. A., and K. M. Eyster. 2010. Genetics and genomics of endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 53(2):403-12. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181db7ca1.
- Heilier, J. F., J. Donnez, F. Nackers, R. Rousseau, V. Verougstraete, K. Rosenkranz, O. Donnez, F. Grandjean, D. Lison and R. Tonglet. 2007. Environmental and host-associated risk factors in endometriosis and deep endometriotic nodules: a matched case-control study. *Environmental Research*. 103(1):121-9. 10.1016/j.envres.2006.04.004.
- Hemmings R, M. Rivard, D. L. Olive, J. Poliquin-Fleury, D. Gagné, P. Hugo and D. Gosselin. 2004. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 81(6):1513-21. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.10.038
- Hruska K. S., P. A. Furth, D. B. Seifer, F. I. Sharara and J. A. Flaws. 2000. Environmental factors in infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 43(4):821-9.
- Hughes CL, W. G. Foster, S. K. Agarwal, and L. Mettler. 2015 The Impact of Endometriosis on the Health of Women. *Biomed Research International*. 365951. doi: 10.1155/2015/365951
- Johnson N, S. van Voorst, M.C. Sowter, A. Strandell, and B.W. Mol. Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (1):CD002125. doi: 10.1002/14651858.CD002125.pub3.
- Kashima K, T. Ishimaru, H. Okamura, H. Suginami, K. Ikuma, T. Murakami, M. Iwashita, and K. Tanaka. 2004. Familial risk among Japanese patients with endometriosis. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*. 84(1):61-4.
- Kho RM, M.P. Andres, G.M. Borrelli, J.S. Neto, A. Zanluchi, and M.S. Abrão. 2018. Surgical treatment of different types of endometriosis: Comparison of major society guidelines and preferred clinical algorithms. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 51:102-110. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.01.020.

- Koltermann KC, A. Schlotmann, H. Schröder, S.N. Willich, and T. Reinhold. 2016. Economic burden of deep infiltrating endometriosis of the bowel and the bladder in Germany: The statutory health insurance perspective. *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen*. 118-119:24-30. doi: 10.1016/j.zefq.2016.09.006.
- Leconte M, B. Borghese, C. Chapron, and B. Dousset. 2012. [Intestinal endometriosis]. *Presse Medicale*. 41(4):358-66. doi: 10.1016/j.lpm.2011.07.017.
- Liu X, Q. Long, and S.W. Guo. 2016. Surgical History and the Risk of Endometriosis: A Hospital-Based Case-Control Study. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* (9):1217-24. doi: 10.1177/1933719116632921.
- Liu Y, and W. Zhang. 2017. Association between body mass index and endometriosis risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8(29):46928-46936. doi: 10.18632/oncotarget.14916.
- Ma K, K. Majumder, R. Clayton, B. Rajashanker, and E. Ed-Osagie. 2015. Correlation Between Magnetic Resonance Imaging Results and Findings at Surgery for Cases of Severe Endometriosis. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 22(6S):S55. doi: 10.1016/j.jmig.2015.08.148.
- Matalliotakis IM, H. Cakmak, Y.G. Fragouli, A.G. Goumenou, N.G. Mahutte, and A. Arici. 2008. Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 277:389e93.
- Moradi M, M. Parker, A. Sneddon, V. Lopez, and D. Ellwood. 2014. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Women's Health*. 14:123. doi: 10.1186/1472-6874-14-123
- Nisolle M and J. Donnez. 1997. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and Sterility*. 68(4):585-96.
- Nnoaham KE, P. Webster, J. Kumbang, S.H. Kennedy, and K.T. Zondervan. 2012. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Fertility and Sterility*. (3):702-712.e6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.035.
- Nohara M, M. Momoeda, T. Kubota, and M. Nakabayashi. 2011. Menstrual cycle and menstrual pain problems and related risk factors among Japanese female workers. *Industrial Health*. 49(2):228-34.
- Nouri K, J. Ott, B. Krupitz, J.C. Huber, and R. Wenzl. 2010. Family incidence of endometriosis in first-, second-, and third-degree relatives: case-control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8:85. doi: 10.1186/1477-7827-8-85.

- Pandian Z, V.A. Akande, K. Harrild, and S. Bhattacharya. 2008. Surgery for tubal infertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (3):CD006415. doi: 10.1002/14651858.CD006415.pub2.
- Parazzini F, S. Cipriani, F. Bravi, C. Pelucchi, F. Chiaffarino, E. Ricci, and P. Viganò. 2013. A metaanalysis on alcohol consumption and risk of endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 209(2):106.e1-10. doi: 10.1016/j.ajog.2013.05.039
- Pereira N and I. Kligman. 2016. Clinical implications of accessory fallopian tube ostium in endometriosis and primary infertility. *Womens Health (Lond)*. 12(4):404-6. doi: 10.1177/1745505716658897.
- Perini JA, J.V. Cardoso, P.T. Berardo, R. Vianna-Jorge, L.E. Nasciutti, M. Bellodi-Privato, D.E. Machado, and M.S. Abrão. 2014. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health*. 14:117. doi: <http://doi.org/10.1186/1472-6874-14-117>.
- Peterson CM, E.B. Johnstone, A.O. Hammoud, J.B. Stanford, M.W. Varner, A. Kennedy, Z. Chen, L. Sun, V.Y. Fujimoto, M.L. Hediger, G.M. Buck Louis, and ENDO Study Working Group. 2013. Risk factors associated with endometriosis: importance of study population for characterizing disease in the ENDO Study. *American journal of Obstetrics and Gynecology*. 208(6):451.e1-11. doi: 10.1016/j.ajog.2013.02.040.
- Prescott J, L.V. Farland, D.K. Tobias, A.J. Gaskins, D. Spiegelman, J.E. Chavarro, J.W. Rich-Edwards, R.L. Barbieri, and S.A. Missmer. 2016. A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)* 31(7):1475-82. doi: 10.1093/humrep/dew085.
- Rahmioglu N, D.R. Nyholt, A.P. Morris, S.A. Missmer, G.W. Montgomery, K.T. Zondervan. 2014 Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Human Reproduction update*. 20(5):702-16. doi: 10.1093/humupd/dmu015.
- Riccio L.D.G.C., P. Santulli, L. Marcellin, M.S. Abrão, F. Batteux, and C. Chapron. 2018. Immunology of endometriosis. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 50:39-49. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.01.010.
- Saha R, R. Kuja-Halkola, P. Tornvall, and L. Marions. 2017. Reproductive and Lifestyle Factors Associated with Endometriosis in a Large Cross-Sectional Population Sample. *Journal of Women's Health (Larchmt)*. 26(2):152-158. doi: 10.1089/jwh.2016.5795.

- Sampson, J.A. 1927. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v.3, p.93-110.
- Santulli P, L. Marcellin, S. Menard, T. Thubert, B. Khoshnood, V. Gayet, F. Goffinet, P.Y. Ancel, and C. Chapron. 2016. Increased rate of spontaneous miscarriages in endometriosis-affected women. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 31(5):1014-23. doi: 10.1093/humrep/dew035
- Selçuk I, and G. Bozdağ. 2013. Recurrence of endometriosis; risk factors, mechanisms and biomarkers; review of the literature. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 14(2):98-103. doi: 10.5152/jtgga.2013.52385
- Shah D.K., K.F. Correia, A.F. Vitonis, and S.A. Missmer. 2013. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 28(7):1783-92. doi: 10.1093/humrep/det120.
- Shahbazi S. and M. Shahrabi-Farahani. 2016. Evaluation of the correlation between body mass index and endometriosis among Iranian fertile women. *Gynecological Endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 32(2):157-60. doi: 10.3109/09513590.2015.1101439
- Sinaii N, K. Plumb, L. Cotton, A. Lambert, S. Kennedy, K. Zondervan, and P. Stratton. 2008. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertility and Sterility*. 89(3):538-45. Doi: <http://doi.org?10>
- Singh SS and M.W. Suen. 2017. Surgery for endometriosis: beyond medical therapies. *Fertility and Sterility*. 107(3):549-554. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.001.
- Staal AH, M. van der Zanden, and A.W. Nap. 2016. Diagnostic Delay of Endometriosis in the Netherlands. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 81(4):321-4. doi: 10.1159/000441911.
- Trabert B, U. Peters, A.J. de Roos, D. Scholes, and V.L. Holt. 2011. Diet and risk of endometriosis in a population-based case-control study. *The British Journal of Nutrition*. 105(3):459-67. doi: 10.1017/S0007114510003661.
- Tulandi T, A. Felemban, and M.F. Chen. 2001. Nerve fibers and histopathology of endometriosis-harboring peritoneum. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*. 8:95-98.
- Upton K, A.J. de Roos, M.L. Thompson, S. Sathyanarayana, D. Scholes, D.B. Barr, and V.L. Holt. 2013. Organochlorine pesticides and risk of endometriosis: findings from a population-based case-control study. *Environmental Health Perspectives*. 121(11-12):1319-24. doi: 10.1289/ehp.1306648

von Theobald P, J. Cottenet, S. Iacobelli, and C. Quantin. 2016. Epidemiology of Endometriosis in France: A Large, Nation-Wide Study Based on Hospital Discharge Data. *Biomed Research Internacional*. 2016:3260952.

WHO Expert Committee. 1995. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organization*. 854:1–452.

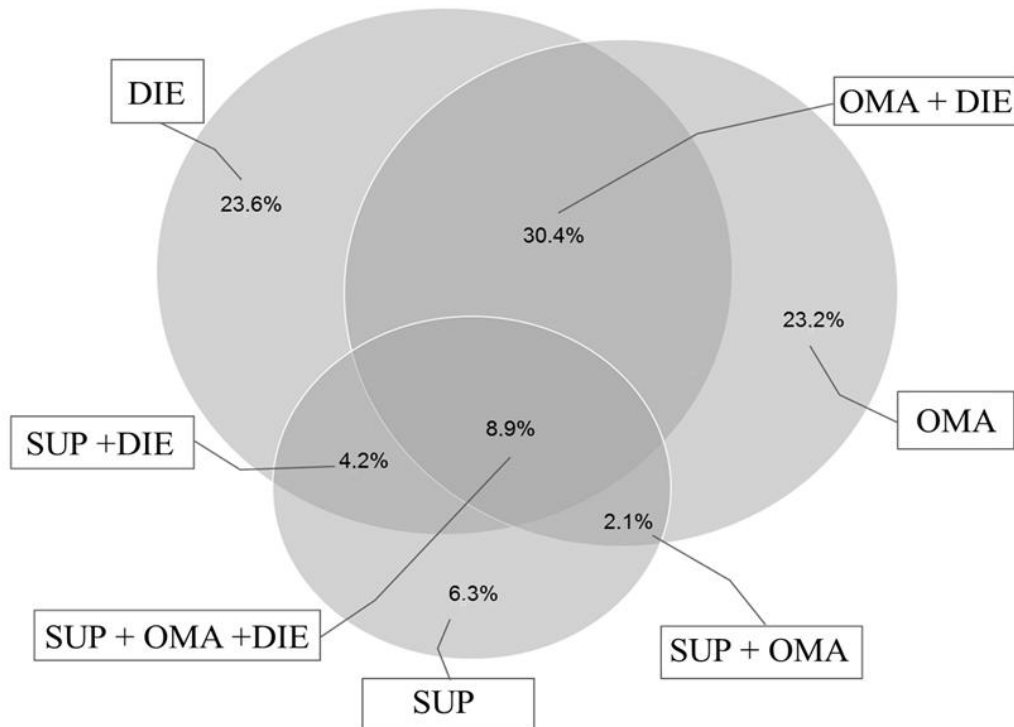


Figure 1. Frequency of the individual and concomitant endometriosis classifications in the study population.

Table 1. Sociodemographic characteristics of the study population (N = 237)

Variables	N (%)	Variables	N (%)	Variables	N (%)	Variables	N (%)
Age (year)		BMI (kg/m²)		Drinking alcohol		Contraception use^c	
≤ 29	44 (18.6)	< 18.5	12 (5.1)	No	96 (40.5)	Oral	208
30 – 39	111 (46.8)	18.5 – 24.9	81 (34.2)	Yes	100 (42.2)	Injectable	67 (28.3)
≥ 40	73 (30.8)	25 – 29.9	78 (32.9)	Ex-alcoholic	32 (13.5)	DIU	19 (8.0)
Missing	9 (3.8)	30 - 40	60 (25.3)	Missing	9 (3.8)	Missing	1 (0.4)
Marital status		> 40	3 (1.3)	Parity^b		History of endometriosis^d	
Single	78 (32.9)	Missing	3 (1.3)	0	60 (32.3)	No	178
Married	135 (57.0)	Physical activity		1	59 (31.7)	Yes	47 (19.8)
Divorced/separated	13 (5.5)	No	93 (39.2)	2	34 (18.3)	Missing	12 (5.1)
Widowed	1 (0.4)	Yes ^a	136 (57.4)	≥ 3	19 (10.2)		
Missing	10 (4.2)	Missing	8 (3.4)	Missing	14 (7.5)		
Education level		Smoking status		Spontaneous abortion^b			
Primary school	33 (13.9)	Smoker	22 (9.3)	No	142 (76.3)		
High school	114 (48.1)	Never smoker	192 (81.0)	Yes	37 (19.9)		
Graduate education	82 (34.6)	Ex-smoker	22 (9.3)	Missing	7 (3.8)		
Missing	8 (3.4)	Missing	1 (0.4)				

BMI = body mass index.

^a Past and present physical activity.

^b Fifty-one patients were not included because they did not attempt to get pregnant.

^c A patient can use more than one contraception type.

^d Family history only in first-degree relatives.

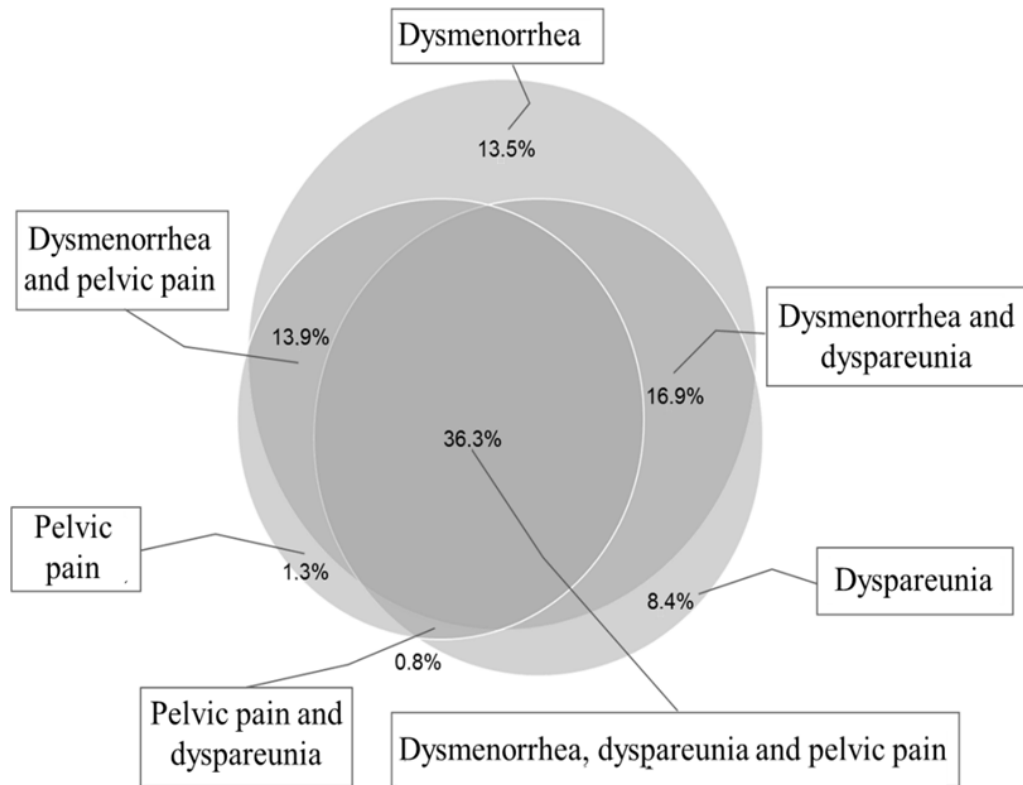


Figure 2. Frequency of the individual and concomitant symptoms in the study population. About 8.9% of endometriosis patients hadn't any gynecologic pain symptoms.

Table 2. Clinical characteristics of the study population (N = 237)

Variables	N (%)	Variables	N (%)
Symptoms^a		Endometriosis staging^d	
Dysmenorrhea	191 (80.6)	I-II	58 (38.9)
Non-cyclic chronic pelvic pain	124 (52.3)	III-IV	83 (55.7)
Deep dyspareunia	150 (63.3)	Missing	8 (5.4)
Cyclical Intestinal Complaints ^b	111 (46.8)	Organs affected by endometriosis^e	
Cyclical Urinary Complaints ^b	54 (22.8)	Ovary	154 (65.0)
Infertility ^c	91 (38.4)	Uterosacral ligament	72 (30.4)
Diagnostic method		Rectosigmoid	59 (24.9)
MRI	88 (37.1)	Peritoneum	50 (21.1)
Laparoscopy	110 (46.4)	Intestine	45 (19.0)
Laparotomy	34 (14.4)	Bladder	40 (16.9)
Laparoscopy and laparotomy	5 (2.1)	Uterine tubes	29 (12.2)
Hormonal treatment for endometriosis		Rectovaginal septum	25 (10.5)
No	158 (66.7)	Others	23 (9.7)
Yes	79 (33.3)		
Endometriosis type			
SUP	31 (13.1)		
OMA	60 (25.3)		
DIE	145 (61.2)		
Missing	1 (0.4)		

MRI = magnetic resonance imaging, SUP = superficial endometriosis, OMA = ovarian endometrioma, DIE = deeply infiltrating endometriosis.

^a A patient can have more than one concomitant symptom.

^b Pain and bleeding.

^c Primary or secondary.

^d Refers to patients diagnosed by surgery (N = 149).

^e A patient can have more than one endometriotic foci.

Table 3. Distribution of demographics and clinical characteristics in subgroups of patients with endometriosis (diagnosis and classification)

Variables	Surgery	Image	<i>P</i> ^a	Non-DIE	DIE	<i>P</i> ^a	Endometriosis	Endometriosis	<i>P</i> ^a
	(n = 149)	(n = 88)		(n = 91)	(n = 145)		I-II (n = 58)	III-IV (n = 83)	
Age (year)									
≤ 29	18 (12.7)	26 (30.2)	0.005	-	-	NS	-	-	NS
30 – 39	76 (53.5)	35 (40.7)		-	-		-	-	
≥ 40	48 (33.8)	25 (29.1)		-	-		-	-	
Marital status									
Single	36 (25.9)	42 (47.7)	0.01	-	-	NS	20 (38.5)	14 (17.7)	0.049
Married	97 (69.8)	38 (43.2)		-	-		31 (59.6)	60 (75.9)	
Divorced/separated	5 (3.6)	8 (9.1)		-	-		1 (1.9)	4 (5.1)	
Widowed	1 (0.7)	0 (0.0)		-	-		0 (0.0)	1 (1.3)	
Education level									
Primary school	-	-	NS	19 (22.1)	14 (9.9)	0.02	-	-	NS
High school	-	-		45 (52.3)	68 (47.9)		-	-	
Graduate education	-	-		22 (25.6)	60 (42.2)		-	-	
Smoking status									
Smoker	-	-	NS	23 (25.3)	20 (13.9)	0.03	-	-	NS
Never smoker	-	-		68 (74.7)	124		-	-	
Physical activity									
No	-	-	NS	-	-	NS	29 (53.7)	25 (31.6)	0.01
Yes ^b	-	-		-	-		25 (46.3)	54 (68.4)	

Parity

0	50 (41.3)	10 (19.6)	0.02	-	-	NS	-	-	NS
1	38 (31.4)	21 (41.2)		-	-		-	-	
2	24 (19.8)	10 (19.6)		-	-		-	-	
> 3	9 (7.5)	10 (19.6)		-	-		-	-	

DIE = deeply infiltrating endometriosis, NS (-) = Non-significant results.

^a Chi-square test or Fisher's exact test.

^b Past and present physical activity.

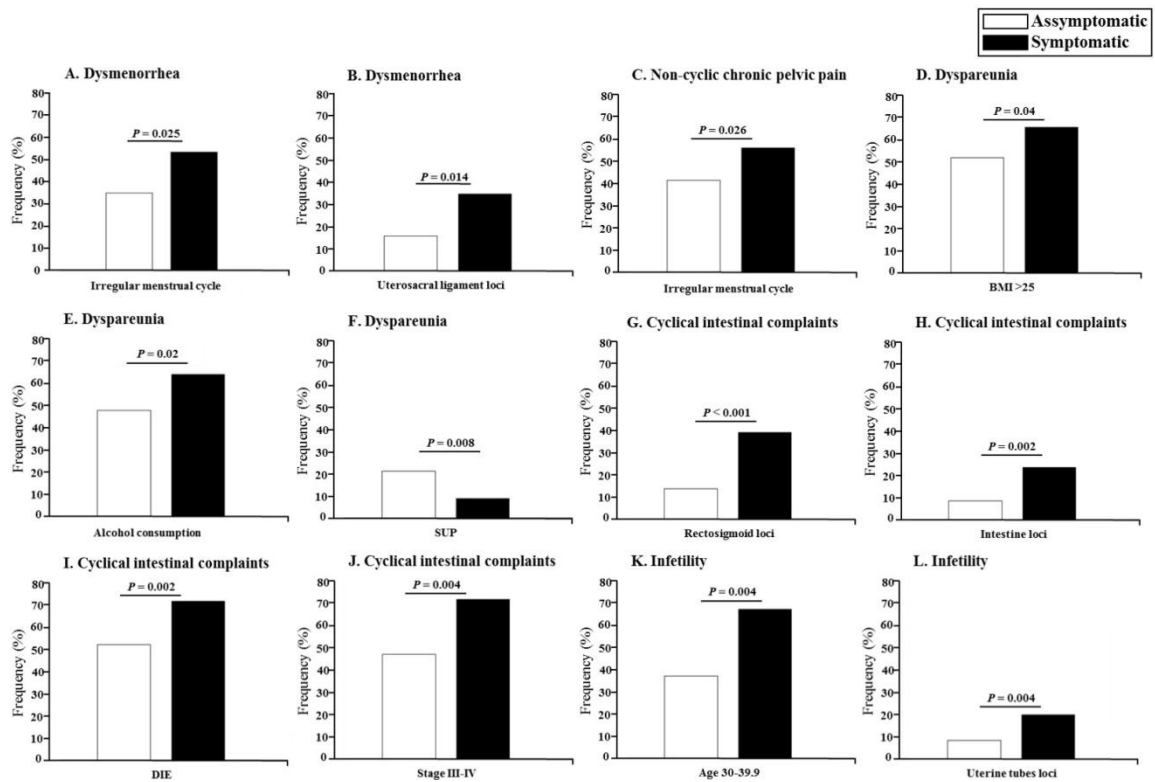


Figure 3. Comparison between asymptomatic and symptomatic women for dysmenorrhea (A-B), non-cyclic chronic pelvic pain (C), deep dyspareunia (D-F), cyclical intestinal complaints (G-J) and infertility (K-L), regarding the demographic, clinical and menstrual characteristics of the study population. P-value from Chi-square test (Pearson P-value).

7.2 SEGUNDO ARTIGO DA TESE

Combined Effect of the PGR +331 C>T, CYP17A1 -34 A>G and CYP19A1 1531 G>A polymorphisms on the risk of developing endometriosis (publicado em 2017, na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia)

Neste artigo foi avaliada a influência dos SNPs *PGR +331C > T*, *CYP17A1 -34A > G* e *CYP19A1 1531G > A* no desenvolvimento da endometriose, em mulheres atendidas no HFSE e HMF. Este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito combinado desses SNPs com o desenvolvimento da endometriose. Participaram deste estudo 161 casos com confirmação histopatológica de endometriose, bem como aquelas diagnosticadas por RNM com EPI, e 179 mulheres com diagnóstico laparoscópico negativo da doença. Ao comparar os dois grupos (controle e casos de endometriose), não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas dos SNPs *PGR +331C > T*, *CYP17A1 -34A > G* e *CYP19A1 1531G > A*, mesmo considerando os sintomas, classificação e estadiamento da endometriose. No entanto, o genótipo combinado *PGR+331TT/ CYP17A1 -34AA/ CYP19A11531AA* foi positivamente associado com a endometriose (OR = 1,72; IC 95% = 1,09-2,72), sugerindo uma interação gene-gene na susceptibilidade à doença.



Combined Effect of the PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G and CYP19A1 1531G > A Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis

Efeito combinado dos polimorfismos PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G e CYP19A1 1531G > A no risco de desenvolvimento da endometriose

Jéssica Vilarinho Cardoso^{1,2} Daniel Escorsim Machado¹ Renato Ferrari³ Mayara Calixto da Silva¹ Plínio Tostes Berardo⁴ Jamila Alessandra Perini^{1,2}

¹Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Unit, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Post-graduation in Public Health and Natural Environment Program, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Gynecology Institute, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Hospital Moncorvo Filho, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Gynecology Service, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Address for correspondence: Jamila Alessandra Perini, PhD, Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy Unit, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av. Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203 - Campo Grande, 23070-200 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil (e-mail: jAMILAPERINI@yahoo.com.br; jamila.perini@pq.cnpq.br).

Rev Bras Ginecol Obstet

Abstract

Purpose To evaluate the magnitude of the association of the polymorphisms of the genes *PGR*, *CYP17A1* and *CYP19A1* in the development of endometriosis.

Methods This is a retrospective case-control study involving 161 women with endometriosis (cases) and 179 controls. The polymorphisms were genotyped by real-time polymerase chain reaction using the TaqMan system. The association of the polymorphisms with endometriosis was evaluated using the multivariate logistic regression.

Results The endometriosis patients were significantly younger than the controls (36.0 ± 7.3 versus 38.0 ± 8.5 respectively, $p = 0.023$), and they had a lower body mass index (26.3 ± 4.8 versus 27.9 ± 5.7 respectively, $p = 0.006$), higher average duration of the menstrual flow (7.4 ± 4.9 versus 6.1 ± 4.4 days respectively, $p = 0.03$), and lower average time intervals between menstrual periods (25.2 ± 9.6 versus 27.5 ± 11.1 days respectively, $p = 0.05$). A higher prevalence of symptoms of dysmenorrhea, dyspareunia, chronic pelvic pain, infertility and intestinal or urinary changes was observed in the case group when compared with the control group. The

Keywords

- ▶ polymorphisms
- ▶ estrogens
- ▶ endometriosis
- ▶ biomarkers

received
August 23, 2016
accepted
March 23, 2017

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604097>,
ISSN 0100-7203.

Copyright © by Thieme Revinter
Publicações Ltda, Rio de Janeiro, Brazil

License terms



interval between the onset of symptoms and the definitive diagnosis of endometriosis was 5.2 ± 6.9 years. When comparing both groups, significant differences were not observed in the allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* 1531G > A, even when considering the symptoms, classification and stage of the endometriosis. The combined genotype *PGR* +331TT/*CYP17A1* -34AA/*CYP19A1*1531AA is positively associated with endometriosis (odds ratio [OR] = 1.72; 95% confidence interval [95%CI] = 1.09–2.72).

Conclusions The combined analysis of the polymorphisms *PGR*-*CYP17A1*-*CYP19A1* suggests a gene-gene interaction in the susceptibility to endometriosis. These results may contribute to the identification of biomarkers for the diagnosis and/or prognosis of the disease and of possible molecular targets for individualized treatments.

Resumo

Objetivo Avaliar a magnitude de associação de polimorfismos nos genes *PGR*, *CYP17A1* e *CYP19A1* no desenvolvimento da endometriose.

Métodos Este é um estudo retrospectivo do tipo caso-controle, envolvendo 161 mulheres com endometriose (casos) e 179 controles. Os polimorfismos foram genotipados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando o sistema TaqMan. A associação dos polimorfismos estudados com a endometriose foi avaliada pela regressão logística multivariada.

Resultados As pacientes com endometriose eram significativamente mais jovens do que os controles ($36,0 \pm 7,3$ versus $38,0 \pm 8,5$, respectivamente, $p = 0,023$), apresentaram um índice de massa corporal menor ($26,3 \pm 4,8$ versus $27,9 \pm 5,7$, respectivamente, $p = 0,006$), maior tempo médio de duração do fluxo menstrual ($7,4 \pm 4,9$ versus $6,1 \pm 4,4$ dias, respectivamente, $p = 0,03$) e menor tempo médio do intervalo entre as menstruações ($25,2 \pm 9,6$ versus $27,5 \pm 11,1$ dias, respectivamente, $p = 0,05$). Uma maior prevalência dos sintomas de dismenorrea, dispareunia, dor pélvica crônica, infertilidade, alterações intestinais e urinárias foi observada no grupo casos comparado ao grupo controle. O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo de endometriose foi de $5,2 \pm 6,9$ anos. Comparando os dois grupos, não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G e *CYP19A1* 1531G > A, e nem considerando os sintomas, a classificação e o estadiamento da endometriose. O genótipo combinado *PGR* +331TT/*CYP17A1* -34AA/*CYP19A1*1531AA está associado positivamente com a endometriose (razão de possibilidades [RP] = 1,72; intervalo de confiança de 95% [IC95%] = 1,09–2,72).

Conclusões A análise combinada dos polimorfismos *PGR*-*CYP17A1*-*CYP19A1* sugere uma interação gene-gene na susceptibilidade à endometriose. Estes resultados podem contribuir para a identificação de biomarcadores para o diagnóstico e/ou prognóstico da doença, assim como de possíveis alvos moleculares para um tratamento individualizado.

Palavras-chave

- polimorfismos
- estrógenos
- endometriose
- biomarcadores

Introduction

Endometriosis is a benign gynecological estrogen-dependent disease characterized by the presence of endometrial tissue out of the uterine cavity, affecting nearly 10% of women of reproductive age. Symptoms may include dysmenorrhea, dyspareunia, chronic pelvic pain and infertility.¹ The pathogenesis and the molecular mechanisms that are involved in the development of endometriosis are not yet

clear, and hereditary susceptibility is an area of growing investigation for the identification of genetic polymorphisms that may lead to an increased risk of developing the disease.^{2,3}

Estrogen performs a fundamental role in endometriosis, which predominantly occurs in women of reproductive age who have high estrogen production.^{4,5} An increase in enzyme expression is responsible for the estrogen synthesis and reduction of progesterone receptor (PGR) expression

observed in samples of endometrial injuries, but these phenomena are not found in controls.^{6,7} As endometriosis is an estrogen-dependent disease, genetic polymorphisms involved in the biosynthesis and regulation of estrogens could be considered possible biomarkers for its diagnosis and/or prognosis. Cytochrome P450 17A1 (CYP17A1) is involved in the initial stages of estrogen synthesis, converting pregnenolone into 17 α -hydroxypregnenolone and, subsequently, into dehydroepiandrosterone. Furthermore, cytochrome P450 19A1 (CYP19A1) acts in the final stage by converting androstenedione into estrone, and testosterone into estradiol.^{4,8} The enzyme CYP17A1, also known as 17 α -hydroxylase, is encoded by the gene with the same name, located in chromosome 10q24.3.⁸ The single nucleotide polymorphism (SNP) CYP17A1 -34A > G is located in the 5' untranslated region (UTR) of the CYP17A1 gene, and it causes a significant increase in the expression of 17 α -hydroxylase.⁸ A different gene product, the aromatase enzyme, is encoded by the gene CYP19A1, which is located in chromosome 15q21. The SNP CYP19A1 1531G > A is found in the 3'UTR of this gene, and it causes a significant change in the levels of circulating estradiol.⁸ Progesterone is also involved in the pathogenesis of endometriosis, as it is a strong antagonist of estrogen, and thus plays an essential role in the regulation of endometrial cell proliferation.⁶ The PGR gene, located in chromosome 11q22-q23, is responsible for encoding both progesterone receptor isoforms (PR-A and PR-B) by transcribing from alternative promoters.⁹ The SNP PGR +331C/T, located in the gene promoter region, creates an additional TATA box, and causes higher transcription of PR-B.⁹

As the SNPs PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G and CYP19A1 1531G > A are located near potential elements that regulate their respective genes, interfering with the levels of expression of the corresponding proteins, it becomes relevant to evaluate the influence of these SNPs in the development of endometriosis. To date, 12 studies have evaluated the association of the SNPs PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G and CYP19A1 1531G > A in the development of endometriosis in different populations. However, the results of the analyses are controversial.¹⁰⁻²¹ In this context, the objective of this study was to evaluate the magnitude of the association of the SNPs PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G and CYP19A1 1531G > A with the development of endometriosis in women treated in two public reference hospitals in Brazil.

Methods

Study Design

This was a retrospective, case-control study approved by the Human Research Ethics Committees of two of our institutions (under protocols number 414/11 and 1.244.29 respectively), both located in the city of Rio de Janeiro, Brazil. All participating patients ($n = 340$) provided written informed consent, and visited one of the two institutions between March 2011 and October 2015. The research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, which was revised in 2008. Patients with a surgical diagnosis (after

laparoscopy or laparotomy) of endometriosis with histological confirmation of the disease, as well as those diagnosed by magnetic resonance imaging (MRI), were considered the case group ($n = 161$). The control group ($n = 179$) consisted of women with a negative diagnosis of endometriosis, after laparoscopy or laparotomy for tubal ligation ($n = 48$) or for the treatment of benign diseases, such as myoma ($n = 52$), ovarian cysts ($n = 30$), hydrosalpinx ($n = 5$), or for other reasons ($n = 44$). Women with any history or diagnosis of cancer or adenomyosis were excluded.²

The stage of the endometriosis was determined according to the revised American Fertility Society classification, which divides the disease into four stages: I (minimum), II (mild), III (moderate) and IV (severe).²² Regarding the classification of the endometriosis, we considered the proposal of Nisolle and Donnez:²³ superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA), and deep infiltrative endometriosis (DIE). Superficial endometriosis and ovarian endometrioma may be found in association with deep endometriosis,²⁴ and the cases in which this association was observed were considered DIE.

The body mass index (BMI) was calculated as the weight (kg) divided by the height squared (m^2). Only severe and incapacitating symptoms of pain were included. Women who failed to conceive after one year of regular, contraceptive-free intercourse were considered infertile. Cyclical intestinal or urinary symptoms were defined as bowel and/or urinary pain and/or bleeding coinciding with menstrual periods.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from the peripheral blood sample using a genomic DNA extraction kit (Genomic DNA Extraction, Real Biotech Corporation, Banqiao City, Taiwan), according to the manufacturer's instructions.

Genotyping of PGR +331C > T (rs10895068), CYP17A1 -34A > G (rs743572) and CYP19A1 1531G > A (rs10046) SNPs was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the TaqMan system. Oligonucleotides and probes specific to each SNP were obtained from Applied Biosystems: rs10895068 (C_27858738_10), rs743572 (C_2852784_30) and rs10046 (C_8234731_30). For all SNPs, PCRs were performed with 30 ng of template DNA, 1 \times TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), and with each primer and probe assay at 1 \times dilution, and H₂O to 8 μ l. The PCR conditions were: 95 $^{\circ}$ C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 92 $^{\circ}$ C for 15 seconds, and annealing at 60 $^{\circ}$ C for 1 minute. Allele-detection was performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), and the genotypes were then determined directly.

Statistical Analyses

The continuous variables were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), and the differences between means were evaluated using the Student's *t*-test. The categorical data were expressed as percentages, and evaluated by the Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test, when applicable. For each SNP, the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated, and the allelic and genotypic

Combined Effect of Gene Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis Cardoso et al.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the study population (N = 340)

Variable	Controls (N = 179)	Cases (N = 161)	p*
Age (years)	n (%)		
18–29	30 (16.8)	29 (18.0)	0.011
30–39	60 (33.5)	79 (49.1)	
≥ 40	86 (48.0)	48 (29.8)	
No information	3 (1.7)	5 (3.1)	
Marital status			
Married/partner	96 (53.6)	111 (68.9)	0.046
Single	53 (29.6)	38 (23.7)	
Divorced/Widow	5 (2.8)	1 (0.6)	
No information	25 (14.0)	11 (6.8)	
Level of Schooling			
Elementary education	38 (21.3)	24 (14.9)	< 0.001
High school	89 (49.7)	60 (37.3)	
Higher education	26 (14.5)	67 (41.6)	
No information	26 (14.5)	10 (6.2)	
BMI			
< 18.5	3 (1.7)	7 (4.4)	0.013
18.5–24.9	48 (26.8)	48 (29.8)	
25–29.9	50 (27.9)	63 (39.1)	
30–40	65 (36.3)	35 (21.7)	
> 40	13 (7.3)	8 (5.0)	
Infertility			
Primary	19 (10.6)	53 (32.9)	< 0.001
Secondary	3 (1.7)	16 (9.9)	
None**	133 (74.3)	58 (36.1)	
No attempt	20 (11.2)	32 (19.9)	
No information	4 (2.2)	2 (1.2)	
Parity			
0	19 (10.6)	53 (32.8)	< 0.001
1	23 (12.8)	37 (23.0)	
2	58 (32.5)	27 (16.8)	
3 or more	55 (30.7)	10 (6.2)	
No attempt	20 (11.2)	32 (20.0)	
No information	4 (2.2)	2 (1.2)	
Symptoms***			
Dysmenorrhea	29 (16.1)	77 (47.5)	< 0.001
Chronic pelvic pain	70 (38.9)	124 (76.5)	
Dyspareunia	50 (27.8)	102 (63.0)	
Cyclical urinary complaints****	9 (6.4)	41 (27.5)	
Cyclical intestinal complaints****	8 (6.0)	74 (49.7)	

Abbreviation: BMI, body mass index.

Notes: *p-value obtained by Pearson's Chi-squared (χ^2) test. **Number of fertile women. ***The same woman can have more than one symptom. ****Pain or bleeding during the menstrual period.

distributions were compared between cases and controls by the χ^2 test or Fisher's exact test. To evaluate the association between the SNPs and the development of endometriosis, as well as the presence of symptoms, the classification and staging of the disease were used to estimate the odds ratios (ORs) and their respective 95% confidence intervals (95% CIs), with adjustment for possible confounding factors, using a multivariate logistic regression. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM Corp., Armonk, NY, US) software, version 20.0.

Results

The endometriosis cases were diagnosed through laparoscopy ($n = 90$, 55.9%), laparotomy ($n = 27$, 16.8%) or MRI ($n = 44$, 27.3%), and 87 (54%) were classified as DIE. Of the 117 surgery cases, 37 (31.6%) presented stages I-II diseases, and 80 (68.4%) presented stages III-IV. The most common locations of the endometriotic lesions were in the ovary (31%), followed by the intestine (19%), and the uterosacral ligaments (15%). The average age of the endometriosis patients at the time of diagnosis was 31.5 ± 7.5 , and the average time for disease diagnosis, which was the time since the beginning of the symptoms until the definitive diagnosis, was 5.2 ± 6.9 years.

In **Table 1**, the demographic and clinical data from the study population are described. The patients with endometriosis were significantly younger than the controls (36.0 ± 7.3 versus 38.0 ± 8.5 respectively, $p = 0.023$), and presented a higher education level (41.6% versus 14.5%), as well as a lower BMI (26.3 ± 4.8 versus 27.9 ± 5.7 respectively, $p = 0.006$). The number of infertile women (primary or secondary) was significantly higher in the case group (42.9%) than in the control group (12.3%), and nearly 63% of the women from the control group had 2 or more children. The patients with endometriosis presented a higher prevalence ($p < 0.001$) of symptoms, including dysmenorrhea, dyspareunia, chronic pelvic pain, and urinary and intestinal changes. Considering the characteristics of the menstrual cycle, a significant difference was detected between cases and controls in relation to the average duration of the menstrual flow (7.4 ± 4.9 versus 6.1 ± 4.4 days respectively, $p = 0.03$) and the average interval between menstrual periods (25.2 ± 9.6 versus 27.5 ± 11.1 days respectively, $p = 0.05$).

When comparing the allelic and genotypic frequencies of the SNPs *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* G > A between the cases and controls (**Fig. 1**), no significant differences were detected, even when considering the staging and endometriosis classification (data not shown). The allelic distribution of the SNPs *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* G > A in relation to the absence or presence of symptoms (dysmenorrhea, pelvic pain, dyspareunia, infertility, and urinary and intestinal problems, for example) in the endometriosis patients is summarized in **Fig. 2**. Considering the symptoms of the disease, no significant differences were found.

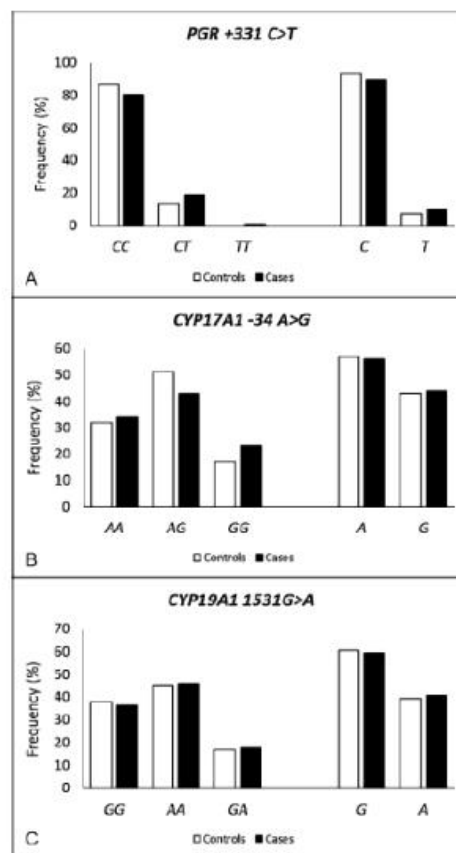


Fig. 1 Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* G > A in the study population.

A combined analysis of the three studied SNPs (*PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* G > A), compared between the endometriosis cases and controls, was performed to investigate whether the presence of more than 1 SNP would increase the risk of developing the disease (**Table 2**). It has been observed that relative to the combined wild-type genotype (*PGR* +331CC/*CYP17A1* -34AA/*CYP19A1*1531GG), the combined genotype *PGR* +331TT/*CYP17A1* -34AA/*CYP19A1*1531AA is associated with an increased risk of developing endometriosis. A combined analysis of the *PGR* +331C > T, *CYP17A1* -34A > G and *CYP19A1* G > A genotypes was also performed in relation to the absence or presence of symptoms (dysmenorrhea, pelvic pain, dyspareunia, infertility, and urinary and intestinal problems, for example) in the endometriosis patients. However, no significant differences were found (data not shown).

In **Table 3**, we describe the variant allele frequencies of the SNPs *PGR* +331 T, *CYP17A1* -34 G and *CYP19A1* A in

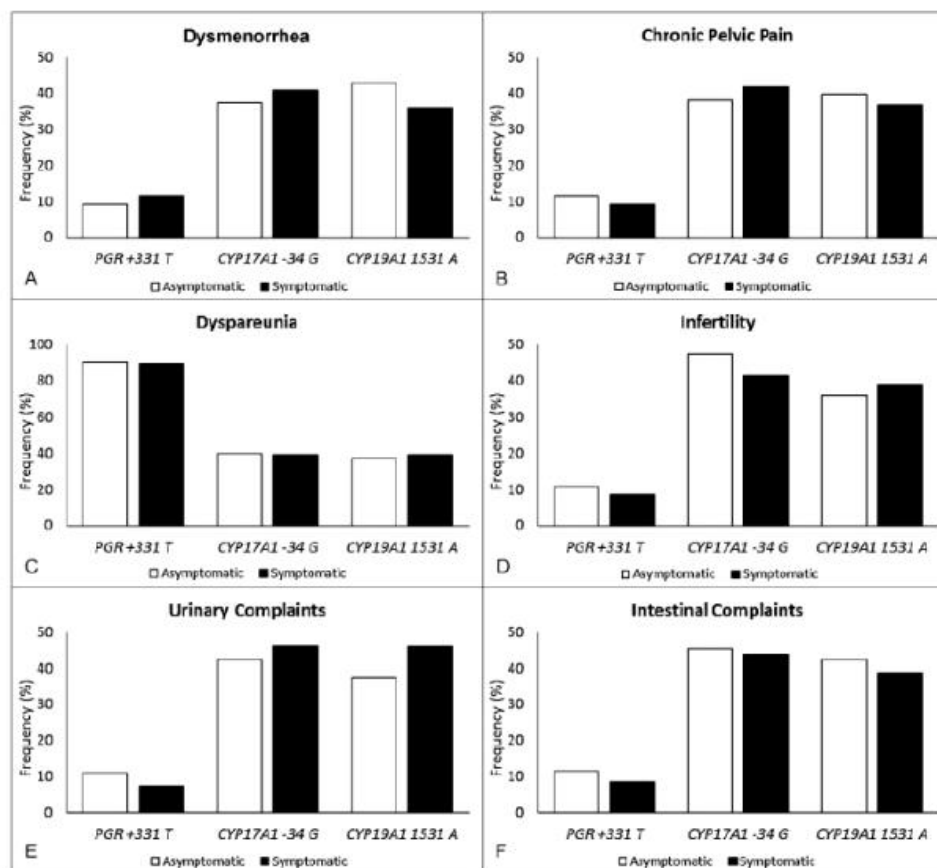


Fig. 2 Minor allelic frequencies of the polymorphisms studied among symptomatic and asymptomatic endometriosis patients.

different populations. The allele frequency *PGR +331 T* varied between 2% and 10% and 5% and 10% in the cases and controls respectively, based on 3 studies that have evaluated this SNP, including the present one. The SNP rs743572 has been evaluated in 7 studies, in addition to the present study, and the frequency of the *CYP17A1 -34 G* allele varied between 35% and 58% in the cases and between 31% and 63% in the controls. In addition to our study, 4 other studies also evaluated the SNP rs10046, and the allele frequency of *CYP19A1 1531 A* varied between 35% and 58% and between 41% and 60% in the cases and controls respectively.

Discussion

Endometriosis is a complex multifactorial gynecological disease caused by the combination of hormonal, genetic and environmental factors, as well as immunological processes. Estrogen and progesterone are essential in the regu-

lation of endometrial tissue growth, and, as such, they may play a central role in the pathogenesis of endometriosis.^{5,6} In this study, a positive association between the combined genotype *PGR +331TT/CYP17A1 -34AA/CYP19A1 1531AA* and the development of endometriosis was observed.

Supporting our results, neither Lamp et al,¹⁸ in Estonia, nor Trabert et al,¹⁹ in the United States, could find an association with only the *PGR +331T* allele. However, van Kaam et al,¹⁵ in the Netherlands, observed a protective effect ($OR = 0.22$; $95\%CI = 0.06-0.77$) for the development of endometriosis. In agreement with our findings, 5 studies from China,¹³ Japan,¹⁰ Turkey,¹⁷ Italy¹⁶ and the United States¹⁹ failed to observe an association between the SNP *CYP17A1 -34G* and endometriosis. However, 2 studies in the Chinese population^{11,12} found a positive association between endometriosis and the *CYP17A1 -34A* allele ($p = 0.046$ and $p = 0.009$). With relation to the SNP *CYP19A1 1531G > A*, none of the studies found an association with endometriosis,

Combined Effect of Gene Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis Cardoso et al.

Table 2 Combined genotype frequencies of the polymorphisms *PGR +331C > T*, *CYP17 -34A > G* and *CYP19 1531G > A* between controls and cases, and their association with the risk of endometriosis

Genotypes	Controls N (%)	Cases N (%)	p *	OR (95%CI)**
<i>PGR +331C > T</i> , <i>CYP17 -34A > G</i> and <i>CYP19 1531G > A</i>				
WT / WT / WT	23 (13.5)	11 (7.3)		1***
WT / WT / VAR	29 (17.1)	28 (18.6)	0.20	1.82 (0.73–4.57)
WT / VAR / VAR	70 (41.2)	60 (40.0)	0.17	1.35 (0.88–2.05)
VAR / WT / WT	2 (1.2)	4 (2.7)	0.18	1.57 (0.82–3.00)
VAR / VAR / WT	7 (4.1)	10 (6.7)	0.20	1.23 (0.90–1.67)
VAR / WT / VAR	1 (0.6)	7 (4.7)	0.02	1.72 (1.09–2.72)
WT / VAR / WT	25 (14.7)	22 (14.7)	0.15	1.13 (0.96–1.34)
VAR / VAR / VAR	13 (7.6)	8 (5.3)	0.87	1.02 (0.85–1.21)

Abbreviations: 95%CI, 95% confidence interval; OR, odds ratio.

Notes: WT|WT|WT, CC|AA|GG; WT|WT|VAR, CC|AA|GA or CC|AA|AA; WT|VAR|VAR, CC|GG|AA or CC|AG|GA or CC|AG|AA or CC|GG|GA; VAR|WT|WT, CT|AA|GG or TT|AA|GG; VAR|VAR|WT, CT|AG|GG or CT|GG|GG or TT|AG|GG or TT|GG|GG; VAR|WT|VAR, CT|AA|GA or CT|AA|AA or TT|AA|GA or TT|AA|AA; WT|VAR|WT, CC|GG|GG or CC|AG|GG; VAR|VAR|VAR, TT|GG|AA; *p-value obtained through the Chi-squared test (Pearson P-value) or Fisher's exact test. **Adjusted by age and BMI. ***Reference group.

Table 3 Frequency of the studied polymorphisms among different populations (endometriosis patients and controls)

Polymorphism	Population	N*	Frequency among the controls (%)	Frequency among the cases (%)	Association with endometriosis	Reference
<i>PGR +331 C > T</i> (rs10895068)			<i>PGR +331 T</i>			
	Estonia	349	8.8	6.7	No association	Lamp et al ¹⁸
	United States	823	4.8	5.1	No association	Trabert et al ¹⁹
	Netherlands	165	9.7	2.3	Protective (T allele)	van Kaam et al ¹⁵
	Brazil	179	6.6	10.1	No association	Present study
<i>CYP17A1 -34 A > G</i> (rs743572)			<i>CYP17A1 -34 G</i>			
	Turkey	93	30.8	57.6	No association	Bozdag et al ¹⁷
	China	247	60.2	50.8	Risk (A allele)	Hsieh et al ¹¹
	China	227	62.9	50.8	Risk (A allele)	Hsieh et al ¹²
	China	510	54.3	58.2	No association	Juo et al ¹³
	Japan	317	39.8	42.9	No association	Kado et al ¹⁰
	United States	823	39.3	34.8	No association	Trabert et al ¹⁹
	Italy	190	37.2	42.3	No association	Vietri et al ¹⁶
	Brazil	180	42.7	44.4	No association	Present study
<i>CYP19A1 1531 G > A</i> (rs10046)			<i>CYP19A1 1531 A</i>			
	Korea	412	55.9	55.8	No association	Hur et al ¹⁴
	Estonia	349	59.8	55.0	No association	Lamp et al ¹⁸
	China	371	56.4	57.5	No association	Wang et al ²⁰
	China	202	41.0	35.3	No association	Yang et al ²¹
	Brazil	180	39.4	40.6	No association	Present study

Abbreviations: CYP17A1, cytochrome P450 17A1; CYP19A1, cytochrome P450 19A1; PGR, progesterone receptor.

Note: *N total number of individuals included in the study (cases + controls).

which is similar to our results.^{14,18,20,21} To date, no study has investigated the combined effect of the SNPs *PGR +331TT/CYP17A1 -34AA/CYP19A1 1531AA* on the development of endometriosis.

The strength of the present study is that it is the first study performed in the Brazilian population that evaluated the SNPs *PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G* and *CYP19A1 1531G > A* in terms of endometriosis development, while considering the symptoms of the disease. All control patients were surgically evaluated to confirm a negative diagnosis of endometriosis; 27% of them had previously undergone sterilization, and 63% had already had 2 or more children. A limitation of this study was that the controls also included women with other gynecological diseases, providing lower risk estimations. Furthermore, considering the endometriosis patients, 27% were diagnosed by MRI. However, this has been a specific and accurate method for the detection of deep endometriosis.²⁵⁻²⁸

In conclusion, the combined analysis of the polymorphisms *PGR-CYP17A1-CYP19A1* suggests a gene-gene interaction in the susceptibility to endometriosis. The results may contribute to the identification of genetic biomarkers that are able to help in disease diagnosis and/or prognosis, as well as in the identification of possible molecular targets for individualized treatments.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgment

The authors would like to thank Lucas Rafael Lopes and Caroline Passos from Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Brazil, for their technical assistance. This study was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Ary Frauzino - Oncobiologia.

References

- 1 Acien P, Velasco L. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *ISRN Obstet Gynecol* 2013;2013:242-149
- 2 Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C and +936C > T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health* 2014;14:117
- 3 Zondervan KT, Rahmiloglu N, Morris AP, et al. Beyond endometriosis genome-wide association study: from genomics to phenomics to the patient. *Semin Reprod Med* 2016;34(04):242-254
- 4 Bell DW, Brannigan BW, Matsuo K, et al. Increased prevalence of EGFR-mutant lung cancer in women and in East Asian populations: analysis of estrogen-related polymorphisms. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4079-4084
- 5 Barcelos ID, Donabella FC, Ribas CP, et al. Down-regulation of the *CYP19A1* gene in cumulus cells of infertile women with endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2015;30(05):532-541
- 6 Bedaiwy MA, Dahoud W, Skomorovska-Prokvolit Y, et al. Abundance and Localization of Progesterone Receptor Isoforms in Endometrium in Women With and Without Endometriosis and in Peritoneal and Ovarian Endometriotic Implants. *Reprod Sci* 2015;22(09):1153-1161
- 7 Lafay Pilet MC, Schneider A, Borghese B, et al. Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case-control study. *Hum Reprod* 2012;27(01):265-272
- 8 Ghisai M, Eiberg H, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC. Polymorphisms in phase I and phase II genes and breast cancer risk and relations to persistent organic pollutant exposure: a case-control study in Inuit women. *Environ Health* 2014;13(01):19
- 9 De Vivo I, Huggins GS, Hankinson SE, et al. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(19):12263-12268
- 10 Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, et al. Association of the *CYP17* gene and *CYP19* gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002;17(04):897-902
- 11 Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Lin CC, Tsai CH. Cytochrome P450c17alpha 5'-untranslated region T/C polymorphism in endometriosis. *J Genet* 2004;83(02):189-192
- 12 Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Lin CC, Tsai CH. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat and cytochrome P450c17alpha gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 2005;83(03):567-572
- 13 Juo SH, Wang TN, Lee JN, Wu MT, Long CY, Tsai EM. *CYP17, CYP11A1* and *COMT* polymorphisms and the risk of adenomyosis and endometriosis in Taiwanese women. *Hum Reprod* 2006;21(06):1498-1502
- 14 Hur SE, Lee S, Lee JY, Moon HS, Kim HL, Chung HW. Polymorphisms and haplotypes of the gene encoding the estrogen-metabolizing *CYP19* gene in Korean women: no association with advanced-stage endometriosis. *J Hum Genet* 2007;52(09):703-711
- 15 van Kaam KJ, Romano A, Schouten JP, Dunselman GA, Groothuis PG. Progesterone receptor polymorphism +331G/A is associated with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2007;22(01):129-135
- 16 Vietri MT, Cioffi M, Sessa M, et al. *CYP17* and *CYP19* gene polymorphisms in women affected with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;92(05):1532-1535
- 17 Bozdag G, Alp A, Saribas Z, Tuncer S, Aksu T, Gurgan T. *CYP17* and *CYP2C19* gene polymorphisms in patients with endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2010;20(02):286-290
- 18 Lamp M, Peters M, Reinmaa E, et al. Polymorphisms in *ESR1, ESR2* and *HSD17B1* genes are associated with fertility status in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2011;27(06):425-433
- 19 Trabert B, Schwartz SM, Peters U, et al. Genetic variation in the sex hormone metabolic pathway and endometriosis risk: an evaluation of candidate genes. *Fertil Steril* 2011;96(06):1401-1406.e3
- 20 Wang L, Lu X, Wang D, et al. *CYP19* gene variant confers susceptibility to endometriosis-associated infertility in Chinese women. *Exp Mol Med* 2014;46:e103
- 21 Yang X, Chen SQ, Liu M. [Association of the *CYP19* gene polymorphism with genetic susceptibility to endometriosis]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2010;27(06):692-696
- 22 Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67(05):817-821
- 23 Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68(04):585-596
- 24 Chapron C, Santulli P, de Ziegler D, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2012;27(03):702-711

Combined Effect of Gene Polymorphisms on the Risk of Developing Endometriosis Cardoso et al.

- 25 Bianeł-Bodzak A, Szurowska E, Sawicki S, Liro M. The importance and perspective of magnetic resonance imaging in the evaluation of endometriosis. *BioMed Res Int* 2013;2013:436589
- 26 Ma K, Majumder K, Clayton R, Rajashanker B, Ed-Osagie E. Correlation between magnetic resonance imaging results and findings at surgery for cases of severe endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 2015;22(6S):S55
- 27 Barcellos MB, Lasmar B, Lasmar R. Agreement between the preoperative findings and the operative diagnosis in patients with deep endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2016;293(04):845-850
- 28 Ito TE, Abi Khalil ED, Taffel M, Moawad GN. Magnetic resonance imaging correlation to intraoperative findings of deeply infiltrative endometriosis. *Fertil Steril* 2017;107(02):e11-e12

7.3 TERCEIRO ARTIGO DA TESE

Role of cytochrome P450 2C19 polymorphisms and body mass index in endometriosis: A case-control study (publicado em 2017, na revista *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*)

Este artigo investigou a contribuição dos SNPs *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17*, e do IMC como fatores de risco para o desenvolvimento da endometriose. Para este estudo, foram recrutadas do HFSE e HMF 187 casos de endometriose diagnosticados por cirurgia ou RNM e 169 controles com diagnóstico cirúrgico negativo da doença. A frequência do alelo variante do SNP *CYP2C19*2* foi significativamente diferente entre os casos e controles ($P = 0,008$) e, após o ajuste de fatores de confundimento, este SNP foi associado com o aumento do risco de endometriose, considerando todos os casos (OR = 1,83; 95% IC = 1,17 - 2,85) ou apenas EPI (OR = 2,32; 95% IC = 1,42 - 3,77). Além disso, entre as mulheres obesas (IMC 30 - 40), o SNP *CYP2C19*2* foi associado com um maior risco de endometriose (OR = 3,27; 95% IC = 1,55 - 6,89). Estes dados sugerem que o SNP *CYP2C19*2* está associado positivamente com a suscetibilidade à endometriose, e o IMC tem uma interação significativa com esse SNP e o risco de endometriose.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrb

Full length article

Role of cytochrome P450 2C19 polymorphisms and body mass index in endometriosis: A case–control study



Jéssica Vilarinho Cardoso^{a,b}, Maurício Simões Abrão^{c,d}, Plínio Tostes Berardo^e, Renato Ferrari^f, Luiz Eurico Nasciutti^g, Daniel Escorsim Machado^{b,g}, Jamila Alessandra Perini^{a,b,*}

^a Program of Post-graduation in Public Health and Environment, National School of Public Health, Oswald Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University, Rio de Janeiro, Brazil

^c Endometriosis Section, Gynecologic Division, Hospital das Clínicas, HCFMUSP, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Gynecologic Division, BP - The Portuguese Beneficence of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^e Gynecology Service, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^f Gynecology Institute, Hospital Moncorvo Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^g Biomedical Sciences Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2017

Received in revised form 17 October 2017

Accepted 30 October 2017

Available online xxx

Keywords:

Polymorphisms

CYP2C19

Endometriosis

Body mass index

ABSTRACT

Objective: To investigate the contribution of CYP2C19 polymorphisms and body mass index (BMI) in the development of endometriosis.

Study design: This is a case-control study that includes 356 women (187 cases and 169 controls) recruited from two hospitals in the Brazilian public health system. The genotyping analyses of the CYP2C19*2 and CYP2C19*17 polymorphisms were performed using TaqMan allelic discrimination assays, and the association of the studied polymorphisms with endometriosis was evaluated by multivariate logistic regression. Pearson correlation coefficients were used to investigate the interaction between BMI and CYP2C19 polymorphisms.

Results: The variant allele frequencies of CYP2C19*2 were significantly different between cases and controls, and after adjusting for confounding factors, the CYP2C19*2 polymorphism was more frequent in women with endometriosis, considering all cases (CYP2C19*2: OR = 1.83; 95% CI = 1.17–2.85) and only deeply infiltrating endometriosis (DIE) cases (CYP2C19*2: OR = 2.32; 95% CI = 1.42–3.77). BMI was significantly lower in endometriosis patients (26.5 ± 4.68) than in controls (27.8 ± 5.65 , $P < 0.02$). Among obese women (BMI 30–40), the CYP2C19*2 polymorphism had a greater association with endometriosis (CYP2C19*2: OR = 3.27; 95% CI = 1.55–6.89). There was a positive correlation between CYP2C19*2 and BMI 30–40 ($P = 0.004$).

Conclusions: The findings of our study suggest that CYP2C19*2 is positively associated with endometriosis and that BMI may have a significant interaction with CYP2C19*2 and the risk of endometriosis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Endometriosis is a relevant public health problem that affects approximately 10% of reproductive-age women [1]. Endometriosis is an estrogen dependent condition characterized by the presence of functional endometrial tissue outside the uterine cavity and is currently one of the most important causes of female infertility [2]. Although its etiology remains unclear, several studies have

suggested an association with various demographic/personal factors (e.g., BMI, educational attainment and smoke), menstruation (e.g., early menarche and irregular menstrual cycles), reproductive factors (e.g., parity reduction) and genetic factors [3–9].

The growth of endometrial tissue is mediated by aromatase P450, which is a key component of estrogen biosynthesis that promotes the conversion of testosterone into estradiol and androstenedione into outshone [10]. The cytochrome P450 family 2, subfamily C, 19 (CYP2C19), a member of the CYP supergene family, is an important candidate that is present in the estrogen conversion process of estradiol to outshone and in the production of estradiol and outshone 2 α - and 16 α -hydroxylation metabolites.

* Corresponding author at: West Zone State University - UEZO, Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, Zip code 23070-200, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: jamilaperini@ua.uo.br (J.A. Perini).

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.10.027>

0301-2115/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

[11,12]. In addition to its involvement in the biosynthesis of hormones [13], the CYP2C19 enzyme is also involved in the metabolism of many drugs [14], the detoxification of potential carcinogens [15,16], and the bioactivation of some environmental procarcinogens [16]. A series of polymorphisms related to CYP2C19 have been found to play a role in the pathogenesis of endometriosis [17–21]. Among the known allelic variants of CYP2C19, CYP2C19*2 (G681A – splice site mutation) and CYP2C19*17 (C806T – increased gene expression) stand out and are classified as slow and ultra-fast metabolizers, respectively, resulting in decreased or increased metabolic capacity of the enzyme [10,22]. These polymorphisms were selected for this study based on their high frequencies in the Brazilian population, corresponding to 13% for the CYP2C19*2 allele and 17% for the CYP2C19*17 allele [23].

Several studies have shown a significant association between endometriosis and low BMI, but the precise mechanism remains uncertain [4,5,8]. A recent genome-wide association study (GWAS), with 3194 endometriosis cases and 7060 controls, described locus 7p15.2 as being associated with endometriosis and fat distribution, suggesting that both conditions may have a shared genetic basis [6]. In this context, the aim of this study was to investigate the association of CYP2C19 polymorphisms with BMI in women with endometriosis.

Materials and methods

Study design

The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Brazilian *Hospital Federal dos Servidores do Estado* (414/2011) and of the *Hospital Moncorvo Filho* of Federal University of Rio de Janeiro (1.244.294/2015). This case-control study included 356 women recruited from two Brazilian public hospitals that are reference institutions for the diagnosis and treatment of endometriosis in Rio de Janeiro, Brazil, from 2011 through 2016. All participants provided informed consent and completed a demographics questionnaire by interviews during preoperative appointments in the two hospitals of the Brazilian public health system.

A total of 187 patients with endometriosis, diagnosed by laparoscopy (n=96) or laparotomy (n=33) with histological confirmation of the disease or those diagnosed by magnetic resonance imaging (MRI) (n=58), were selected as the case group. According to the disease stages of the patients with surgical diagnosis, stratified by the revised American Fertility Society classification [24], 41 (31.8%) were diagnosed as minimal or mild (Stages I–II), 81 (62.8%) were diagnosed as moderate or severe (Stages III–IV), and 7 (5.4%) had this information missing. According to Nisolle and Donnez, [25] endometriosis may be classified as superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA) or deeply infiltrating endometriosis (DIE). According to this classification, 27 (14.4%) endometriotic patients were classified as SUP, 51 (27.3%) as OMA, and 102 (54.6%) as DIE, and 7 (3.7%) had this information missing. Both superficial peritoneal and ovarian endometrioma may be found in association with deep endometriosis, and such cases were considered DIE [26].

The control group consisted of 169 women with a negative diagnosis of endometriosis by laparoscopy (n=140) or laparotomy (n=29) who had undergone surgery to treat benign diseases, such as ovarian cysts (n=30), myoma (n=52), hydrosalpinx (n=5), tubal ligation (n=48) or other reasons (n=34). The exclusion criteria were women who had been diagnosed with adenomyosis, a previous history or current diagnosis of cancer, hypertension-related chronic kidney disease or rheumatoid arthritis.

BMI was calculated as the weight (kg) divided by the square of height (m²). According to WHO's expert committee [27], the women were classified as underweight (BMI < 18.5), normal

weight (18.5 ≤ BMI < 24.9), overweight (25 ≤ BMI < 29.9), obese (30 ≤ BMI < 40) or morbidly obese (BMI ≥ 40). As described in our previous study [8], only severe and incapacitating symptoms of pain were considered in this study. Infertility was defined as a couple not being able to conceive after one year of regular, contraceptive-free intercourse (primary or secondary) [8].

CYP2C19 genotyping

DNA was extracted using a genomic DNA extraction kit (Genomic DNA Extraction, Real Biotech Corporation, Banqiao City, Taiwan) following the procedures recommended by the manufacturer. The genotyping analyses of the CYP2C19*2 (rs4244285) and CYP2C19*17 (rs12248560) polymorphisms were performed using a TaqMan allelic discrimination assay kit obtained from Applied Biosystems (C_25986767_70 and C_25986767_70, respectively). For all polymorphisms, real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the genotypes were then directly determined.

Statistical analysis

Student's *t*-test was used to compare continuous variables between endometriosis patients and controls, and results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test, when applicable, was applied to compare differences in age, BMI, marital status, education level, and endometriosis clinical symptoms and for the statistical analysis of the distribution frequencies of genotypes and alleles between the two groups. Additionally, the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated by the chi-square test for goodness-of-fit. CYP2C19*1 is the default allele, calculated as CYP2C19*1 = 1 – (CYP2C19*2 + CYP2C19*17). Multivariate logistic regression analyses were performed to identify possible confounding factors in the associations between the polymorphisms and endometriosis or between the polymorphisms and endometriosis features, which was estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI). Pearson's correlation test was used to evaluate the strength of the relationship between the polymorphisms and endometriosis-related BMI. Differences were considered statistically significant when *P* < 0.05. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), version 20.0.

Results

There were significant differences between the cases and controls regarding mean age (35.9 ± 7.29 and 37.7 ± 8.59, respectively, *P* = 0.03), education level (*P* < 0.001) and all endometriosis clinical symptoms (dysmenorrhea, non-cyclic chronic pelvic pain, deep dyspareunia, infertility, cyclical urinary and intestinal symptoms, *P* < 0.001). With regards to the characteristics of the menstrual cycle including menarche age (12.5 ± 1.72 versus 12.5 ± 1.99, respectively, *P* = 0.98), average duration of menstrual bleeding (6.9 ± 4.52 versus 6.5 ± 6.01 days, respectively, *P* = 0.41) and average time interval between menstruations (25.3 ± 8.95 versus 26.9 ± 11.48 days, respectively, *P* = 0.22), there were no significant differences between the two groups. There was a significant difference between the two groups in mean BMI (26.5 ± 4.68 cases and 27.8 ± 5.65 controls, *P* = 0.02). The control group (43.2%) exhibited a higher BMI (obese and morbidly obese) than the endometriosis group (25.7%).

All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. Patients with endometriosis showed a higher frequency of the variant allele CYP2C19*2 than the controls. Conversely, no

significant differences were detected in the allele or genotype distribution of the *CYP2C19*17* polymorphisms between the two groups. Table 1 shows the association analysis of the *CYP2C19*2* and *CYP2C19*17* polymorphisms between control and endometriosis cases, either considering all cases or only DIE patients. Because endometriosis is also affected by clinical and demographic variables, such characteristics should be analyzed in parallel with genetic variations. Such variables were evaluated in multivariate logistic regression models, with only age and BMI remained significant co-factors for endometriosis susceptibility. After adjusting for confounding factors, variant allele and genotypes of the *CYP2C19*2* polymorphism were associated with a higher risk (approximate 2-fold) of endometriosis, either considering all cases or DIE cases (Table 1). In addition, we also observed that the *CYP2C19*2* polymorphism was positively associated with disease susceptibility, considering only stages III–IV of endometriosis (OR = 1.94; 95% CI = 1.14–3.30) (data not shown). No significant association was found for the *CYP2C19*17* polymorphism in endometriosis development considering all cases or DIE cases (Table 1).

Combined analyses of the polymorphisms studied and BMI in endometriosis development were used to evaluate gene-environment interactions. Endometriosis cases had a higher frequency of the *CYP2C19*2* polymorphism for all categories of BMI (<18.5 = 3.7%; 18.5–24.9 = 29.4%; 25–29.9 = 41.2%; 30–40 = 22.5%; >40 = 3.2%) than controls (BMI < 18.5 = 1.8%; 18.5–24.9 = 27.2%; 25–29.9 = 27.8%; 30–40 = 35.5%; >40 = 7.7%). Among women with a BMI 30–40, the variant allele *CYP2C19*2* was associated with a higher risk of endometriosis susceptibility (*CYP2C19*2*: OR = 3.27; 95% CI = 1.55–6.89 and **1/2 + *2/2*: OR = 4.24; 95% CI = 1.68–10.7). There was a relationship between the *CYP2C19*2* polymorphism and obese women (BMI 30–40), which was related to endometriosis (correlation coefficient $r^2 = 0.280$, $P = 0.004$). However, no significant association was observed for the *CYP2C19*17* polymorphism (data not shown).

In addition, we investigated the association of the *CYP2C19*2* and *CYP2C19*17* polymorphisms with the absence or presence of dysmenorrhea, pelvic pain, dyspareunia, infertility, and urinary and intestinal problems in the endometriosis patients, but no significant differences were found (data not shown).

Comment

Estrogen is highly expressed in endometriotic lesions compared with the normal endometrium [28,29]. A recent meta-analysis of 11 genome-wide studies identified five novel loci that were significantly associated with endometriosis risk, implicating genes involved in steroid hormone pathways, such as the estrogen receptor (*ESR1*), and thus reinforcing the important role of this hormone in endometriosis susceptibility [30].

The *CYP2C19*17* polymorphism was not significantly associated with endometriosis risk in our study, in agreement with Painter et al. [19]. However, a lower endometriosis risk was previously observed for carriers of the *CYP2C19*17* allele in only one study [20]. The *CYP2C19*17* variant (in the 5'-flanking region of the gene) may confer a rapid metabolism of *CYP2C19* substrates, which may decrease estrogen levels and, therefore, reduce endometriosis risk [31].

We found that allelic and genotypic variants of *CYP2C19*2* were associated with increased risk of susceptibility to endometriosis. Only four studies have evaluated the association of this polymorphism with the development of endometriosis. Çayan, et al. [17] and Painter et al. [20] proposed that the *CYP2C19*2* polymorphism increased endometriosis risk, corroborating our findings. However, the other two studies did not observe an association of the *CYP2C19*2* polymorphism with the disease [18,19]. This synonymous polymorphism located in exon 5 causes no change to the amino acid sequence, but creates an alternative splice site downstream resulting in a truncated, non-functional protein [32] and a poor metabolizer phenotype [10].

Estrogens are also produced in adipocytes, and the increased production of estrogen is associated with increased adiposity [33]. Reduced or increased estrogen expression has been associated with the prevalence of certain aspects of the metabolic syndrome [34–36], and polymorphisms in estrogen-related genes have been associated with abnormal adiposity [35,37]. We hypothesized that *CYP2C19* could alter circulating estrogen levels and modify the risk of endometriosis influenced by BMI status. Thus, we observed that *CYP2C19*2* is positively associated with endometriosis in women with BMI between 30 and 40. These findings suggest a gene-environment interaction in the susceptibility to endometriosis.

Table 1
Association analysis of the *CYP2C19*2* and *CYP2C19*17* polymorphisms between control and cases (all endometriosis patients or DIE cases).

Polymorphisms	Controls (n = 169)	Endometriosis (n = 187)	P value ^a	OR adjusted (95% CI) ^{b,c}	DIE (n = 102)	P value ^a	OR adjusted (95% CI) ^{b,d}
<i>CYP2C19*2</i>	N (%)				N (%)		
Genotypes							
*1/*1	131 (77.5)	122 (65.3)		1 ^e	61 (59.8)		1 ^e
*1/*2	36 (21.3)	58 (31.0)	0.02	1.83 (1.10–3.06)	35 (34.3)	0.01	2.13 (1.18–3.83)
*2/*2	2 (1.2)	7 (3.7)	0.14	3.49 (0.67–18.1)	6 (5.9)	0.02	6.80 (1.31–35.4)
*1/*2 + *2/*2	38 (22.5)	65 (34.7)	0.01	1.92 (1.17–3.17)	41 (40.2)	0.003	2.39 (1.36–4.20)
Alleles							
*1	298 (88.2)	302 (80.7)			157 (77.0)	0.001	
*2	40 (11.8)	72 (19.3)	0.008	1.83 (1.17–2.85)	47 (23.0)		2.32 (1.42–3.77)
<i>CYP2C19*17</i>	N (%)				N (%)		
Genotypes							
*1/*1	104 (61.5)	124 (66.3)		1 ^e	63 (61.8)		1 ^e
*1/*17	51 (30.2)	55 (29.4)	0.97	0.99 (0.61–1.60)	32 (31.4)	0.94	0.97 (0.51–1.87)
*17/*17	14 (8.3)	8 (4.3)	0.07	0.40 (0.15–1.06)	7 (6.8)	0.53	0.72 (0.26–2.00)
*1/*17 + *17/*17	65 (38.5)	63 (33.7)	0.52	0.86 (0.55–1.36)	39 (38.2)	0.82	1.06 (0.63–1.80)
Alleles							
*1	259 (76.6)	303 (81.0)			158 (67.5)		
*17	79 (23.4)	71 (19.0)	0.19	0.98 (0.96–1.01)	46 (32.5)	0.88	0.99 (0.97–1.03)

Default allele, calculated as $CYP2C19*1 = 1 - (CYP2C19*2 + CYP2C19*17)$. OR: odds ratio; CI: confidence interval; DIE: deep infiltrating endometriosis. ^a Chi-square test or Fisher's exact test. ^b Adjusted by age and BMI. ^c Controls vs. all endometriosis patients. ^d Controls vs DIE. ^e Reference group.

Recent advances in gene technology have led to the discovery of new genes for obesity and infertility susceptibility, as family history and genetic factors play roles in both conditions [38]. Although epidemiological data can be used to better understand endometriosis, further studies are needed to investigate the genetic, environmental, and pathophysiology of BMI decline in women with endometriosis. This is the first study to link CYP2C19 polymorphisms with endometriosis-related BMI. In addition, all of our controls were surgically evaluated to detect endometriosis, excluding the presence of asymptomatic endometriosis. However, this was a hospital-based study conducted in two Brazilian public hospitals over a period of almost 5 years. In addition, the sample size is relatively small, which may be due to the long time required to diagnose endometriosis. Due to the variety in the presentation and severity of clinical symptoms of endometriosis, approximately 5–8 years elapse from the onset of symptoms to the definitive diagnosis of the disease [8,39,40].

In summary, the findings of our preliminary study demonstrate that variants of CYP2C19*2 are positively associated with endometriosis and that BMI may have a significant interaction with CYP2C19*2 and risk of endometriosis.

Conflict of interest

None of the authors declare any conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mayara Calixto from West Zone State University, Rio de Janeiro, Brazil, for technical assistance. This study was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (443741/2014-0), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, Fundação Ary Frauzino – Oncobiologia and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

References

- [1] Buck Louis GM, Hediger ML, Peterson CM, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, et al. ENDO Study Working Group. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertil Steril* 2011;96(2):360–5.
- [2] Acién P, Velasco I. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *SRN Obstetric Gynecol* 2013;2013(July):242149.
- [3] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil Steril* 2011;96(August (2)):366–73 e8.
- [4] Lafay Pillet MC, Schneider A, Borghese B, Santulli P, Souza C, Streuli I, et al. Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case-control study. *Hum Reprod* 2012;27(January (1)):265–72.
- [5] Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C and +936C > T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health* 2014;26(September (14)):117.
- [6] Rahmioglu, Montgomery, Zondervan. Genetics of endometriosis. *Womens Health* 2015;11(5):577–86.
- [7] Chapron C, Lang JH, Leng JH, Zhou Y, Zhang X, Xue M, et al. Factors and regional differences associated with endometriosis: a multi-country, case-control study. *Adv Ther* 2016;33(August (8)):1385–407.
- [8] Cardoso JV, Abrão MS, Vianna-Jorge R, Ferrari R, Berardo PT, Machado DE, et al. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;209(February):25–33.
- [9] Cardoso JV, Machado DE, Ferrari R, Silva MCD, Berardo PT, Perini JA. Combined effect of the PGR +331C > T, CYP17A1 -34A > G and CYP19A1 1531G > A polymorphisms on the risk of developing endometriosis. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2017(January).
- [10] Daly AK. Polymorphic variants of cytochrome P450: relevance to cancer and other diseases. *Adv Pharmacol* 2015;74:85–111.
- [11] Cheng ZN, Shu Y, Liu ZQ, Wang LS, Ou-Yang DS, Zhou HH. Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22(February (2)):148–54.
- [12] Cribb AE, Knight MJ, Dryer D, Guernsey J, Hender K, Tesch M, et al. Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(March (3)):551–8.
- [13] Lavado R, Li J, Rimoldi JM, Schlenk D. Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. *Toxicol Lett* 2014;226(April (2)):182–7.
- [14] Lu YY, Cheng HX, Wang X, et al. Identification of cytochrome P450s involved in the metabolism of 6-benzyl-1-benzoyloxymethyl-5-iodouracil (W-1) using human recombinant enzymes and rat liver microsomes in vitro. *Xenobiotica* 2017;47(August (8)):667–72.
- [15] Yan F, Xu JF, Liu XF, Li XH. Interaction between smoking and CYP2C19*3 polymorphism increased risk of lung cancer in a Chinese population. *Tumour Biol* 2014;35(January (6)):5295–8.
- [16] Dzul-Casnal R, Dominguez-López ML, Olivares-Rubio HF, García-Latorre E, Vega-López A. The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholine esterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. *Ecotoxicology* 2014;23(July (5)):779–90.
- [17] Cayan F, Ayaz I, Alban M, Dilek S, Güntüz LT. Role of CYP2C19 polymorphisms in patients with endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2009;25(August (8)):530–5.
- [18] Bozdag G, Alp A, Saribas Z, Tuncer S, Aksu T, Gurgan T. CYP17 and CYP2C19 gene polymorphisms in patients with endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2010;20(February (2)):286–90.
- [19] Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, Macgregor S, Lin J, Lee SH, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet* 2011;43(January (1)):51–4.
- [20] Painter JN, Nyholt DR, Krause L, Zhao ZZ, Chapman B, Zhang C, et al. Common variants in the CYP2C19 gene are associated with susceptibility to endometriosis. *Fertil Steril* 2014;102(Agust (2)):496–502 e5.
- [21] Cristofolini DM, Amaro A, Mafra F, Sonnewend A, Bianco B, Barbosa CP. CYP2C19 polymorphism increases the risk of endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(January (1)):91–4.
- [22] Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;121(4):512–8.
- [23] Suarez-Kurtz G, Genro JF, de Moraes MO, Ojopi EB, Pena SD, Perini JA, et al. Global pharmacogenomics: impact of population diversity on the distribution of polymorphisms in the CYP2C cluster among Brazilians. *Pharmacogenomics J* 2012;12(June (3)):267–76.
- [24] Revised american society for reproductive medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817–21.
- [25] Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997;68:585–96.
- [26] Chapron C, Santulli P, de Ziegler D, Noel JC, Anaf V, Streuli I, et al. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 2012;27(March (3)):702–11.
- [27] WHO Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995;854:1–452.
- [28] Delvoux B, Grootthuis P, D'Hooghe T, Kyama C, Dunselmann G, Romano A. Increased production of 17beta-estradiol in endometriosis lesions is the result of impaired metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(March (3)):876–83.
- [29] Zhang L, Xiong W, Li N, Liu H, He H, Du Y, et al. Estrogen stabilizes hypoxia-inducible factor 1 α through G protein-coupled estrogen receptor 1 in eutopic endometrium of endometriosis. *Fertil Steril* 2017;107(February (2)):439–47.
- [30] Sapkota Y, Steinhilberdottr V, Morris AP, Fassbender A, Rahmioglu N, De Vivo I, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nat Commun* 2017;24(May (8)):15539.
- [31] Beelen K, Opdam M, Severson TM, Koornstra RH, Vincent AD, Hauptmann M, et al. CYP2C19 2 predicts substantial tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen and no systemic treatment. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139(June (3)):649–55.
- [32] de Moraes SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994;269:15419–22.
- [33] Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* 2013;34(June (3)):309–38.
- [34] Deng HW, Li J, Li JL, Dowd R, Davies KM, Johnson M, et al. Association of estrogen receptor- α genotypes with body mass index in normal healthy postmenopausal Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2748–51.
- [35] Okura T, Koda M, Ando E, Niino N, Ohta S, Shimokata H. Association of polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27(September (9)):1020–7.
- [36] Nilsson M, Dahlman I, Rydén M, Nordström EA, Gustafsson JA, Arner P, et al. Estrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond)* 2007;31(June (6)):900–907 Epub 2007 Jan 16.

- [37] Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *Int J Mol Med* 2002;80:452–60.
- [38] Butler MG, McGuire A, Manzardo AM. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(April (4)):495–508.
- [39] Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health*. 2014;4(October (14)):123.
- [40] Staal AH, van der Zanden M, Nap AW. Diagnostic delay of endometriosis in the Netherlands. *Gynecol Obstet Invest* 2016;81(4):321–4.

7.4 QUARTO ARTIGO DA TESE

Matrix metalloproteinases 3 polymorphism increases the risk of developing advanced endometriosis and infertility: A case-control study (publicado em 2019, na revista *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology: X*)

Este estudo avaliou o papel do SNP *MMP-3* 276G>A como fator de risco para o desenvolvimento da doença e seus sintomas. Foi incluído neste trabalho 283 mulheres com endometriose (casos) e 217 mulheres sem a doença (controles) que foram submetidas a cirurgia laparoscópica ou laparotomia recrutadas de três hospitais públicos brasileiro (FMUSP, HFSE e HMF). A distribuição alélica do SNP *MMP-3* 276G>A foi significativamente diferente entre os dois grupos ($P = 0,03$). O genótipo variante *MMP-3* 276AA foi associado ao aumento do risco de endometriose nos casos com estadiamento III-IV (OR = 2,08; 95% IC = 1,05-4,07 e OR = 1,87; 95% IC = 1,01-3,45). Mulheres inférteis com endometriose apresentaram uma associação positiva na presença do SNP *MMP-3* 276G>A (OR = 3,13; 95% IC = 1,08-9,08 e OR = 3,30; 95% IC = 1,31-8,33). Esses achados sugerem que o SNP *MMP-3* 276G>A está envolvido com os casos de estadiamento III-IV e a infertilidade relacionada à endometriose.



Matrix metalloproteinases 3 polymorphism increases the risk of developing advanced endometriosis and infertility: A case-control study

Jéssica V Cardoso^{a,b}, Daniel E Machado^b, Mayara C da Silva^{a,b}, Plínio T Berardo^{c,d}, Renato Ferrari^e, Maurício S Abrão^{f,g}, Jamila A Perini^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Departamento de Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Instituto de Ginecologia, Hospital Moncorvo Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^f Seção de Endometriose, Divisão de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^g Divisão de Ginecologia, Beneficência Portuguesa de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2019

Received in revised form 3 May 2019

Accepted 5 May 2019

Available online 6 May 2019

Keywords:

Endometriosis
 Polymorphisms
 MMP3
 Infertility
 Angiogenesis

ABSTRACT

Objective: Endometriosis has a complex and multifactorial pathology, and it is considered one of the main causes of infertility nowadays. The angiogenic process, which involves remodeling of extracellular matrix, is crucial for the development of this disease, mainly by the action of the matrix metalloproteinase 3 (MMP-3). It is known that genetic factors can influence endometriosis, thus; we investigated the role of *MMP3* 276G>A polymorphism as a risk factor for the development of the disease and its symptoms.

Study Design: This case-control study included 283 women with endometriosis (cases) and 217 women without the disease (controls) who were submitted to laparoscopic or laparotomy surgery. Real-time polymerase chain reaction performed by *TaqMan* system was applied for all polymorphisms. A multivariate logistic regression was performed to evaluate the association between polymorphism and endometriosis or clinical and gynecological characteristics of the disease, using their respective odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

Results: The allelic frequency of the *MMP3* 276G>A polymorphism was 33.6% in controls and 40.3% in endometriosis cases. The allelic distribution was significantly different between the two ($P=0.03$). The variant genotype of *MMP3* 276AA was associated with increased endometriosis risk in the advanced endometriosis cases (OR: 2.08, 95% CI: 1.05 – 4.07 and OR: 1.87, 95% CI: 1.01 – 3.45). Regarding the symptoms, endometriosis-related infertile women had a positive association with the presence of *MMP3* 276G>A polymorphism (OR: 3.13, 95% CI: 1.08–9.08 and OR: 3.30, 95% CI: 1.31 – 8.33).

Conclusions: These findings suggest that the *MMP3* 276A polymorphism is involved with advanced endometriosis cases and infertility, and these associations may implicate in the behavior of disease.

© 2019 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Endometriosis is a complex gynecological disease characterized by the presence of functional endometrial tissue outside the uterus [1]. It affects approximately 10% of women at reproductive age [2]

and directly disturbs their quality of life. This can be because of the delay and elevated cost of the treatment and diagnosis, beyond the incapacitating symptoms [3,4], of which infertility stands out. A recent study conducted in a Swedish cohort with 3406 women, followed by thirty-nine years, showed an increased rate of endometriosis among women with previous infertility problems [5].

Even though endometriosis' etiology is not completely understood, there is strong evidence that angiogenesis is essential for the establishment and growth of endometriotic lesions [6], and genetic components can be involved in this process [7]. Our previous studies have demonstrated that polymorphisms in genes

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Av. Manoel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, 23070-200, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
 E-mail address: jamilaperini@yahoo.com.br (J.A. Perini).

that regulates the angiogenic process, such as VEGF and KDR, can be involved in endometriosis risk [8,9]. Another important factor for the angiogenesis is the matrix metalloproteinases (MMPs) family, which consists of enzymes involved in extracellular matrix remodeling [10], allowing the angiogenic process. The MMP-3 (stromelysin-1), encoded by *MMP3*, is a key member of the MMPs family, responsible for laminin, fibronectin, gelatins (I, -V) collagens and cartilage proteoglycans degradation [11]. Some studies have already shown that MMP3 is overexpressed both in endometrial tissue [12] and peripheral blood samples [13].

MMP3 gene is located on chromosome 11, and one of the most studied variants of this gene is the *MMP3* 276G>A single nucleotide polymorphism (SNP), within exon 2 [14]. *MMP3* 276G>A causes an amino acid change (Glu>Lys) at residue 45, that can lead to an interference in MMP-3 interaction with amino acids in this region, therefore, affecting on MMP-3 activation and function [14]. Then, this SNP causes in conformational changes that result in a quick autocatalytic activation to generate a fully active enzyme by removing a portion of the prodomain [14].

To date, there is no data in the literature regarding the association between the *MMP3* 276G>A SNP and endometriosis. Therefore, the objective of this study was to investigate the role of *MMP3* 276G>A polymorphism as a risk factor for the development of endometriosis and its possible associations with endometriosis' symptoms.

Materials and Methods

Study design

This case-control study was approved by the Human Research Ethics Committees of Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (FMUSP 910/2011), Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE 414/2011) and Hospital Moncorvo Filho (HMF 1.244.294/2015). All patients were recruited at three Brazilian public hospitals, when assigned for laparoscopic or laparotomy procedures, regardless of the therapeutic indication. Subjects diagnosed with endometriotic lesions by surgery and histologically confirmed were considered as cases (n=283). In the control group, had no visible ectopic endometrium sites during surgical laparoscopy or laparotomy, that was proposed in order to perform a tubal ligation or treatment of benign diseases (n=217). Women presenting previous diagnostic of adenomyosis, cancer, rheumatoid arthritis or hypertension-related chronic kidney disease where excluded from the study. All participants signed informed consent and their epidemiological, gynecological and clinical data were already published in our previous article [9].

As demonstrated in our previous study [9], endometriosis cases were divided into two groups according to the revised American Fertility Society classification: early stage (women with minimal or mild endometriosis - stage I and II, respectively; n=109) and advanced stage (women with moderate or severe endometriosis - stage III and IV, respectively; n=164). Besides, 10 participants had no information about the staging.

Only women with severe and incapacitating pain were considered as symptomatic cases. Infertility was defined as not being able to get pregnant after one year of regular intercourse and without contraceptive methods use [8,9]. In the present study, the number of infertile women with endometriosis was 126 (44.5%).

Polymorphisms genotyping

A blood sample was obtained from the participants for subsequent DNA extraction, as previously described [8], and to genotyping of the *MMP3* 276G>A (rs679620) polymorphism. Polymorphism amplification and detection was carried by 7500

Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan probe (C_3047717_1_). All PCR conditions were described by Perini et al, 2014 [8].

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with SPSS (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA) program version 20.0 and were considered as statistically significant when value of *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Hardy-Weinberg equilibrium for the *MMP3* 276G>A SNP was calculated by the goodness-of-fit Chi-Square test. Allelic and genotypic distribution of this polymorphism was performed by gene direct counting and their frequencies were compared using the Chi-Square Test or, when appropriate, the Fisher's exact test. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated by a multivariate logistic regression model to evaluate the possible associations between SNP and endometriosis or between SNP and gynecological and clinical features of endometriosis. As a final regression model, each variable was introduced in the univariate analysis considering its biological significance and its statistical significance with a *P*-value of 0.20 input and a *P*-value of 0.05 output. Age and Body Mass Index (BMI) were considered as confounding factors in this model.

Results

The mean age and mean BMI in the endometriosis cases were 34.9 ± 7.2 and 24.5 ± 4.6 , respectively, and in the control group were 37.5 ± 8.4 and 27.9 ± 5.8 , respectively. *MMP3* 276G>A SNP was in Hardy-Weinberg equilibrium and the frequency of variant allele *MMP3* 276A (Fig. 1) in the endometriosis cases (40.3%) was statistically higher than the control group (33.6%). Assuming a recessive model for the *MMP3* 276G>A SNP, a significant difference in genotype distribution was observed (*MMP3* 276GG+GA versus 276AA). Patients carrying the *MMP3* 276A allele or the AA genotype had higher risk of developing endometriosis than the *MMP3* 276GG genotype (Table 1). The variables age, BMI, educational attainment, menopausal status and family history of endometriosis were assessed in logistic regression models according to our previous study [9]. After adjustment by significant co-factors that remained in logistic regression model (age and BMI), the *MMP3* 276A allele and the 276AA genotype presented a borderline significant difference. Conversely, *MMP3*

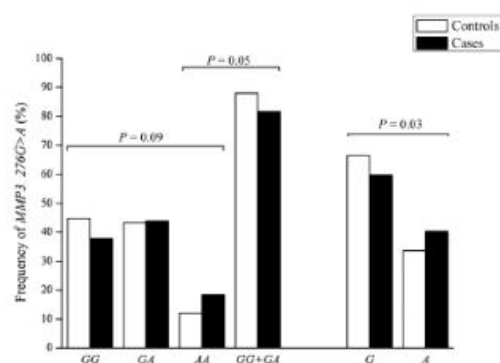


Fig. 1. Allelic and genotypic distribution of the *MMP3* 276G>A polymorphism in the endometriosis cases and control group. *P*-value from Chi-square test (Pearson *P*-value).

Table 1
Association analyses of the MMP3 276G>A polymorphism with endometriosis risk.

MMP3 276G>A	Controls (n=217)	Cases (n=283)	ORc (95% CI)	ORa (95% CI)	Cases III/IV (n=164)	ORc (95% CI) ^b	ORa (95% CI) ^b
Genotype							
GG	97 (44.7)	107 (37.8)	1 ^a	1 ^a	59 (36.0)	1 ^a	1 ^a
GA	94 (43.3)	124 (43.8)	1.20 (0.82 – 1.76)	1.28 (0.82 – 2.00)	69 (42.0)	1.21 (0.77 – 1.89)	1.18 (0.71 – 1.98)
AA	26 (12.0)	52 (18.4)	1.81 (1.05 – 3.13)	1.79 (0.96 – 3.34)	36 (22.0)	2.28 (1.25 – 4.15)	2.08 (1.05 – 4.07)
GG+GA	191 (88.0)	231 (81.6)	1 ^a	1 ^a	128 (78.0)	1 ^a	1 ^a
AA	26 (12.0)	52 (18.4)	1.65 (0.99 – 2.75)	1.52 (0.87 – 2.65)	36 (22.0)	2.07 (1.19 – 3.59)	1.87 (1.01 – 3.45)
Allele							
G	288 (66.4)	338 (59.7)	1 ^a	1 ^a	187 (57.0)	1 ^a	1 ^a
A	146 (33.6)	228 (40.3)	1.33 (1.03 – 1.73)	1.15 (0.99 – 1.33)	141 (43.0)	1.49 (1.11 – 2.00)	1.19 (1.01 – 1.41)

ORc = crude odds ratio; ORa = odds ratio adjusted by age and BMI; CI = Confidence Interval; Cases III/IV = Staging of moderate and/or advanced endometriosis (III/IV).

^a Reference group.

^b Controls vs Cases III/IV.

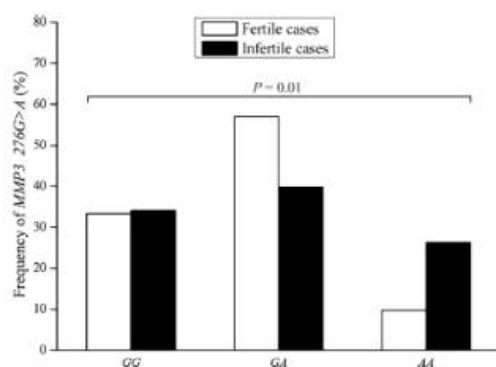


Fig. 2. Allelic and genotypic distribution of the MMP3 276G>A polymorphism in fertile and infertile women with endometriosis. P-value from Chi-square test (Pearson P-value).

276G>A SNP presented an increased risk of the advanced stage of endometriosis in either the crude or adjusted OR (Table 1).

Considering the symptoms of endometriosis, we observed that infertile women with endometriosis (26.2%) had a high frequency of the variant genotype MMP3 276AA when compared to fertile women (9.7%) with endometriosis (Fig. 2). The presence of the MMP3 276AA genotype (versus MMP3 276GG and 276GG+GA) was positively associated with endometriosis-related infertility (OR: 3.13; 95% CI: 1.08 – 9.08 and OR: 3.30, 95% CI: 1.31 – 8.33, adjusted by age and BMI). Regarding other endometriosis symptoms (dysmenorrhea, deep dyspareunia, non-cyclic chronic pelvic pain, intestinal and urinary cyclical complaints) no significant differences were found between the two groups (data not shown).

Comment

Our results revealed a positive association between the MMP3 276A allele and advanced stage endometriosis. No other study has investigated the association of this SNP in the disease's susceptibility; however, various studies have showed that SNPs involved in genes that take part in extracellular matrix remodeling have been associated with endometriosis and with advanced stage of the disease [16,15]. The MMP3 276G>A SNP is localized in a coding region that causes a change of Glutamine to Lysine, leading to an increase MMP3 activity [14], which can consequently lead to increased angiogenesis and thus the development of endometriosis. Therefore, the MMP3 276G>A

SNP has previously been reported in association with gastric adenocarcinoma [16].

Endometriosis is a benign disease; however, it shares several characteristics with malignant cancer [17]. One of these invasive properties is related to the increase of tissue proteolytic activity, resulting in the development of advanced endometriosis [18]. In these cases, overexpression of MMPs can be related with this aggressive behavior. It has been showed an association between MMP3 gene expression and the expression level of RAS proteins in metastasis formation [19]. Besides that, MMP3 can activate collagenases and release cell surface molecules, like E-cadherin, an important contributor to cancer development [20]. These observations reinforce the role of MMP3 in advanced endometriosis.

Endometriosis can negatively affect the reproductive process; however, this cause-and-effect relation was not established yet [5]. In this study, it was observed an increased risk of endometriosis-related infertility in the presence of the MMP3 276G>A SNP. Under normal physiological conditions, progesterone levels increase during fertilization to maintain endometrium integrity. It is known that the progesterone inhibits MMPs expression [21], and that withdrawal of this hormone may increase MMPs production. An *in vitro* study conducted by Lahav-Baratz et al. (2004) observed high expression and activity of MMP-3 in stromal cell culture of endometrial tissue from infertile patients; however, the MMP-3 activity could not be detected after 2 weeks of progesterone administration [22]. Since that 276A SNP increases MMP3 activity [14] and MMP-3 276AA genotype women were more likely to be infertile, it is possible to suggest that the invasive action of MMP in the endometrium may predispose to infertility. Thus, the relationship between MMP3 SNP in endometriosis-associated infertility needs to be further investigated.

Endometriosis is a multifactorial disease and results from genome wide studies are more informative than those of each polymorphism separately investigated [23]. Nevertheless, is relevant to extract data from distinct populations, with different environmental backgrounds, to construct a database to comprehension of complex diseases [24], such as endometriosis. As far as we know, the present study is the first one to focus on the possible contribution of the MMP3 276G>A SNP to the susceptibility to endometriosis or endometriosis-related infertility. Despite the limited number of subjects, this study was conducted in three reference centers for endometriosis treatment and had only controls with surgical diagnosis of absence of endometriosis, which increases credibility and ensures representativeness of data.

In conclusion, we observed that MMP3 276G>A SNP was positively associated with advanced stage of endometriosis and with endometriosis-associated infertility. Further studies are needed to associate this SNPs with the expression of gene in endometrial tissue, and thus confirm whether MMP3 276G>A SNP can be considered an endometriosis biomarker.

Conflict of interest

All the authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank all the staff of the three recruitment hospitals (FMUSP, HFSE and HMF) for their technical assistance and who have contributed to realization this study. This study was supported by the Brazilian agency (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ).

References

- [1] Benagiano G, Brosens I, Lippi D. The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;78:1–9.
- [2] Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, Shalev V. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG* 2018;125(January 1):55–62 Epub 2017 Jun 14.
- [3] Facchin F, Barbara G, Saita E, Mosconi P, Roberto A, Fedele L, et al. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 2015;36(4):135–41.
- [4] Koltermann KC, Schlotmann A, Schröder H, Willich SN, Reinhold T. Economic burden of deep infiltrating endometriosis of the bowel and the bladder in Germany: The statutory health insurance perspective. *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitswes* 2016;118–119(December):24–30.
- [5] Gao M, Allebeck P, Mishra GD, Koupil I. Developmental origins of endometriosis: a Swedish cohort study. *J Epidemiol Community Health* 2019;(January):19.
- [6] Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 2009;16:140–6.
- [7] Ueda M, Yamashita Y, Takehara M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, et al. Gene expression of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 2002;16(October 5):391–402.
- [8] Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health* 2014;14:117.
- [9] Cardoso JV, Abrão MS, Vianna-Jorge R, Ferrari R, Berardo PT, Machado DE, et al. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. *EJOG* 2017;209 (February 25–33 Epub 2016 Oct 29).
- [10] Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:155–64.
- [11] Johansson N, Saarialho-Kere U, Airoola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 1997;208:387–97.
- [12] Gilabert-Estelle's J, Ramo'n LA, Espan' F, Gilabert J, Vila V, R'eganon E, et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod* 2007;22:2120–7.
- [13] Mabrouk M, Elmakly A, Caramelli E, Farina A, Mignemi G, Venturoli S, et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2012;285(May 5):1307–12.
- [14] Chen Y, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Influence of variations across the MMP-1 and -3 genes on the serum levels of MMP-1 and -3 and disease activity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2012;13(January 1):29–37.
- [15] Ye H, He Y, Wang J, Song T, Lan Z, Zhao Y, et al. Effect of matrix metalloproteinase promoter polymorphisms on endometriosis and adenomyosis risk: evidence from a meta-analysis. *J Genet* 2016;95(September 3):611–9.
- [16] Lin Y, Liu J, Jin L, Jiang Y. Polymorphisms in matrix metalloproteinases 2, 3, risk by regulating enzyme activity in gastric and increase recurrence and mortality adenocarcinoma. *Oncotarget* 2017;20(November 62):105971–83 8.
- [17] Vlahos NE, Kalampokas T, Fotiou S. Endometriosis and ovarian cancer: a review. *Gynecol Endocrinol* 2010;26(March 3):213–9.
- [18] Machado DE, Berardo PT, Palmero CY, Nasciutti LE. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;19(January 29):4.
- [19] Baruch RR, Melinscak H, Lo J, Liu Y, Yeung O, Hurta RA. Altered matrix metalloproteinase expression associated with oncogene-mediated cellular transformation and metastasis formation. *Cell Biol Int.* 2001;25(5):411–20.
- [20] Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012;39(December 4):535–49.
- [21] Keller NR, Sierra-Rivera E, Eisenberg E, Osteen KG. Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1 α in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1611–9.
- [22] Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Kraiem Z, Wiener-Megnazi Z, Ishai D, et al. Early embryo-endometrial signaling modulates the regulation of matrix metalloproteinase-3. *Fertil Steril* 2004;82(October 3):1029–35.
- [23] Rahmioglu N, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Insights into Assessing the Genetics of Endometriosis2. *J Curr Obstet Gynecol Rep* 2012;1 (September 3):124–37 Epub 2012 Jun 15.
- [24] Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res* 2005;573(1–2):54–69.

7.5 QUINTO ARTIGO DA TESE

Systematic review of genome-wide association studies on susceptibility to endometriosis
(no prelo);

Neste artigo foi realizado uma revisão sistemática de 15 estudos de GWA na endometriose, com o objetivo de descrever os genes e os SNPs associados à doença. Todos os artigos tiveram uma qualidade adequada avaliada pelo método STROBE e PRISMA (77% e 81%, respectivamente). No geral, foram analisados 35.022 casos de endometriose e 181.760 controles e o número de participantes em cada estudo foi bem variado (171 a 17.045 para os casos e 308 a 150.021 para os controles), com predomínio da etnia europeia. A maioria dos casos de endometriose (86%) foi diagnosticada por cirurgia, enquanto a seleção do grupo controle foi diferente entre os estudos. Cerca de 47% dos estudos realizaram apenas uma etapa de análise (estágio de descoberta) e 53% realizaram as análises de descoberta e replicação. Onze genes/SNPs foram associados ao risco de endometriose em mais de um artigo (cromossomo 1, 2, 6, 7, 9 e 12; *WNT4*, *GREB1*, *FNI*, *IL1A*, *ETAA1*, *RND3*, *ID4*, *NFE2L3*, *CDKN2B-AS1* e *VEZT*). Os SNPs foram localizados em regiões intergênicas e intrônicas, suas frequências dos alelos de risco variaram entre os estudos e seus resultados foram conflitantes. Como conclusão, pode-se destacar as variantes *WNT4 rs7521902*, *GREB1 rs13394619*, *FNI rs1250248*, *IL1A rs6542095* e *VEZT rs10859871* devido às suas altas frequências encontradas nos estudos e a via e função que cada gene influencia no desenvolvimento da endometriose para serem posteriormente replicadas e validadas em outros estudos com diferentes populações.

Systematic review of genome-wide association studies on susceptibility to endometriosis.

Jéssica Vilarinho Cardoso^{a,b}, Jamila Alessandra Perini^{a,b}, Daniel Escorsim Machado^a,
Ricardo Pinto^c, Rui Medeiros^c

^a Program of Post-graduation in Public Health and Environment, National School of Public Health, Oswald Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

^b Research Laboratory of Pharmaceutical Sciences, West Zone State University, Rio de Janeiro, Brazil;

^c Molecular Oncology Group-CI, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal.

Abstract

Objective: Endometriosis is a complex and heterogeneous disease in which extrinsic and intrinsic factors, such as genetics, provide to the disease development. Genome-wide association (GWA) studies may be essential to recognize genetic variants associated with the endometriosis risk. However, in the current literature there are some conflicting results between these studies. The aim of the present study was to undertake a systematic review about endometriosis GWA studies, to describe the disease-associated genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) to try to understand the endometriosis etiopathogenesis, besides to discuss possible bias of conflicting results among these studies.

Methods: This study is a systematic review of GWA studies in endometriosis published until February 28th, 2019 by PubMed database, considering the following descriptors: endometriosis and (“polymorphism” or “SNP” or “genetic polymorphism” or “variants” or “locus”) and (“GWA” or “Genome-wide” or “Genome wide” or “Genetic association study”). The included studies were analyzed with methodological rigor (STROBE and PRISMA) to enable better quality of case-control and meta-analysis studies, respectively.

Results: Of the 80 articles found, only 15 were eligible. All articles had appropriate quality evaluated by STROBE and PRISMA checklists (77% and 81%, respectively). Overall, 35,022 endometriosis cases and 181,760 controls were analyzed. The number of participants in each study was quite different (171 to 17,045 for the cases and 308 to

150,021 for the controls), with a predominance of European ethnicity. Most endometriosis cases (86%) were diagnosed by surgery, while selection of the control group was different among studies. About 47% performed only one stage (discovery stage) and 53% performed both the discovery and replication analyses. Eleven genes/SNPs were associated with endometriosis risk in more than one article (chromosome 1, 2, 6, 7, 9 and 12; *WNT4*, *GREB1*, *FNI*, *IL1A*, *ETAA1*, *RND3*, *ID4*, *NFE2L3*, *CDKN2B-AS1* and *VEZT*). SNPs were localized in intergenic and intronic regions, their risk allele frequencies varied among the studies and their results were conflicting.

Conclusions: In summary, *WNT4* rs7521902, *GREB1* rs13394619, *FNI* rs1250248, *IL1A* rs6542095 and *VEZT* rs10859871 variants are highlighted due to high frequency and pathways and function that each gene influences in the development of endometriosis. However, the replication and validation of these variants in different populations are necessary for a better understanding of the endometriosis etiopathogenesis, in order to optimize the diagnosis and improve the efficiency of clinical treatment of the disease.

Key words: Genome-wide; Endometriosis; Polymorphisms; Systematic Review.

Introduction

Endometriosis is a benign gynecological condition characterized by the presence of stromal and glandular tissue outside the uterine cavity, and may involve several organs including ovaries, peritoneum, sacral uterine ligaments, rectovaginal septum, rectum/sigmoid, and bladder (Acién, 2013). It is one of the most common gynecological diseases, affecting approximately 10% of women in the reproductive phase, and usually has symptoms associated with dysmenorrhea, deep dyspareunia, chronic pelvic pain and infertility (Benagiano, 2014; Eisenberg, 2017), sometimes leading the patients to poor quality of life and high social and economic costs (Facchin, 2015; Koltermann, 2016).

According with the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) guideline, the only way to definitively diagnose and/or treat endometriosis is direct visualization of the endometriotic implant via laparoscopic examination, followed by removal and histological confirmation (Kennedy et al., 2005). The pharmacological treatment involves administration of progesterone oral contraceptives, gonadotropin-releasing hormone agonists and aromatase inhibitors. However, these treatments are ineffective and generally associated with negative adverse effects (Vercellini et al., 2016; Becker et al., 2017). Thus, the discovery of specific biomarkers and genes involved in disease development and maintenance could contribute and direct efforts to optimize the diagnosis and improve the efficiency of endometriosis clinic treatment (Hansen et al, 2010, Borrelli et al 2014).

Endometriosis' etiology remains unclear (Baranov et al., 2014); the genetic basis of endometriosis can contribute for approximately half the variation on the risk of developing the disease, with an estimated heritability of 51% (Vercellini et al., 2013). In view of this and a more specific diagnosis and treatment for endometriosis, several genome-wide association (GWA) studies have been published to identify genetic variants, specifically single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (Uno et al., 2010, Adachi et al., 2010, Painter et al., 2011, Nyholt et al., 2012, Albertsen et al., 2013, Pagliardini et al., 2013, Rahmioglu et al., 2014, Borghese et al., 2015, Sapkota et al., 2015, Steinhorsdottir et al., 2016, Wang et al., 2016, Uimari et al., 2017, Sapkota et al., 2017a, Sapkota et al., 2017b, Sobalska-Kwapis et al., 2017). GWA studies are an important method for the identification of genetic variants associated with common diseases/traits, involving the analysis of thousands of variants across the genome, in large groups of individuals (MacArthur, 2017). Despite the endometriosis is regarded as

a complex and multifactorial disease, GWA studies may contribute to a better understanding of the disease, based on the identification of alterations in the genome, and can be used to find genetically heterogeneous loci that could help in the establishment of molecular diagnostic tests and putative more effective treatment options with identify new pharmacological targets (Fung et al., 2015).

Therefore, this systematic review aimed: (1) to describe GWA studies in endometriosis, in order to verify which SNPs were associated with the disease, hence, suitable for subsequent replication/validation analyses; (2) to discuss the pathways in which these SNPs are involved and their importance in endometriosis, trying to contribute to the understanding of the genetic basis of this pathology; and (3) to explain the possible causes of conflicting associations between these GWA studies.

Materials and Methods

Search strategy

Papers published before February 28th, 2019 involving GWA studies conducted in endometriosis were identified resorting to the PubMed database, following the combined key terms: endometriosis and (“polymorphism” or “SNP” or “genetic polymorphism” or “variants” or “locus”) and (“GWA” or “Genome-wide” or “Genome wide” or “Genetic association study”). The reference list of each selected article was also reviewed to find other studies that were not identified in the database search through the descriptors included in this systematic review. In addition, to increase the reliability of our work, we searched the GWAS Catalog database (www.ebi.ac.uk/gwas), a publicly available resource of all published GWAS and respective association results (MacArthur, 2017).

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion of articles in this review was carried out according to the following established criteria: (1) endometriosis GWA studies based either on a case-control or meta-analysis study design, (2) studies published in English language, (3) publications with available full-text and (4) studies published until February 2019. The exclusion criteria were: (1) publications with no GWA perform involving polymorphisms in endometriosis, (2) review studies and (3) publications that have only replicated previous findings.

Data extraction

After the selection of the manuscripts and complete reading, the following information was collected: author; publication year; study type; cohort of study; number of cases and controls; cases and controls sources; inclusion and exclusion criteria of cases and controls; endometriosis staging; quality control; most associated SNPs; risk allele frequency (RAF) data; and endometriosis association data. Chromosomal location, dbSNP ID, locus, position (bp), risk allele, gene and SNP location in the gene (with their respective distances when relevant - Kb) were collected from the studies included in this review or from the dbSNP database (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/).

Quality assessment of studies included

The information of the included studies was extracted and independently analyzed by two reviewers (JVC and RP), based on the checklist *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE), for quality screening of case-control studies, and on the checklist *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), for quality evaluation of meta-analysis studies. Twenty-two assessment items of STROBE were used in this systematic review, receiving a score from 0 to 1 and those studies with a score higher than 50% were approved (von Elm, 2014). Regarding the PRISMA evaluation, twenty-seven assessment items were checked and the studies that obtained a score higher than 80% were approved (Liberati, 2009).

Results

The flowchart of the GWA studies included in this systematic review is shown in figure 1. Initially, 80 publications was found through the search strategy previously mentioned. After reading the titles and abstracts, 47 studies did not perform a GWA study in endometriosis, 7 review studies and 10 replication studies, resulting in 64 removed articles. Thus, 16 articles were submitted to full-text evaluation and after this reading, one article was excluded, because it was also a replication study. Finally, 15 articles were included in this systematic review, of which 7 were case-control and 8 were meta-analysis studies.

In table 1 are described the baseline characteristics and methodological quality of included studies in this systematic review. Three case-control studies were hospital based only (20%) and 80% were both hospital and population based. A total of 216,782 participants (181,760 controls and 35,022 cases with endometriosis) were accounted in this review, with predominance (80%) of European-ancestry individuals, followed by those of Japanese origin. About 47% performed only one stage (discovery stage) and 53% performed both the discovery and replication analyses. The number of SNPs identified within each study varied between 2 and 22, being Pagliardini *et al.*, 2013 the study with the least number of SNPs associated with endometriosis and Sapkota *et al.*, 2017b and Sobalska-Kwapis *et al.*, 2017 the two with the highest number of identified markers. Only Steinhorsdottir *et al.*, 2016 did not apply the stringent quality control to individual dataset. In relation to the quality of the 15 included studies evaluated by STROBE and PRISMA checklists, all articles presented a percentage greater than 77% and 81%, respectively.

Endometriosis diagnosis in the case-control studies was mostly performed by surgical confirmation, being laparotomy and laparoscopic the preferred methods (Painter *et al.*, 2011, Albertsen *et al.*, 2013, Borghese *et al.*, 2015, Steinhorsdottir *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016, Uimari *et al.*, 2017, Sobalska-Kwapis *et al.*, 2017). Borghese *et al.*, 2015 categorized endometriosis in SUP, OMA and DIE, and Wang *et al.*, 2016 used only women with OMA in their analyzes. Only Uno *et al.*, 2010 considered as a diagnosis method the multiple clinical symptoms, physical examinations and/or laparoscopic surgery; however had no information about endometriosis stage (Table 2).

The selection of the control group was different among the seven case-control studies (Table 2): 29% used women with other diseases (Uno *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2016); 43% used women with negative diagnosis of endometriosis after surgery (Albertsen *et al.*, 2013, Borghese *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016); 14% used women with negative diagnosis of endometriosis by magnetic resonance imaging (MRI) (Albertsen *et al.*, 2013) or who had declared themselves as healthy women (Sobalska-Kwapis *et al.*, 2017); and 29% used women who had no evidence of endometriosis diagnosis; however did not report negative diagnostic criteria (Steinhorsdottir *et al.*, 2016, Uimari *et al.*, 2017).

Characteristics of the SNPs associated with endometriosis in more than one article are described in table 3. There were a total of eleven SNPs: five of them

localized on chromosome 2 (rs13394619, rs1250248, rs6542095, rs4141819 and rs6734792), two on chromosome 7 (rs12700667 and rs7798431) and others on chromosome 1, 6, 9 and 12 (rs7521902, rs7739264, rs1537377 and rs10859871, respectively). Most SNPs are located in intergenic regions (rs6542095, rs4141819, rs6734792, rs12700667, rs7798431, rs7521902, rs7739264, rs1537377 and rs10859871), and only two (rs13394619 and rs1250248) in intronic regions. Regarding the gene location of these SNPs: rs6542095 is localized 2.3 kb downstream of *IL1A* (interleukin 1 alpha) gene; rs4141819 lies 227 kb upstream of *ETAA1* (ETAA1 activator of ATR kinase); rs6734792 is located 280 kb upstream of *RND3* (Rho family GTPase 3); rs12700667 and rs7798431 SNPs are localized near *NFE2L3* (nuclear factor, erythroid 2 like 3) gene (localized 290 kb and 331 kb downstream, respectively); rs7521902 positions 21 kb upstream of *WNT4* (Wnt family member 4) gene; rs7739264 is localized 52 kb upstream of *ID4* (inhibitor of DNA binding 4); rs1537377 SNP lies 48 kb upstream of *CDKN2B-AS1* (cyclin dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA) gene; rs10859871 is located 17 kb upstream of *VEZT* (vezatin, adherens junctions transmembrane protein) gene; rs13394619 is localized within the *GREB1* (growth regulating estrogen receptor binding 1) gene; and rs1250248 lies within the *FNI* (fibronectin 1).

The molecular pathways and SNPs associated with endometriosis susceptibility are reported in Figure 2. Three SNPs, rs6542095 (near *IL1A*) and rs12700667 and rs7798431 (near *NFE2L3*) are implicated in inflammatory pathways. The rs13394619 SNP, lying in *GREB1* is related to a hormonal pathway; rs1250248, in *FNI*, is involved in an angiogenic pathway and rs7521902 (close to *WNT4*) has implications in embryonic development. Other two SNPs, rs1537377 (being *CDKN2B-AS1* the nearest gene) and rs7739264 (near *ID4*), might have impact in transcriptional processes. Lastly, rs6734792 (close to *RND3*) and rs10859871 (near *VEZT*) are involved in cytoskeleton regulation; while rs4141819 (adjacent to *ETAA1*) is involved in DNA replication.

Risk allele frequency (RAF) and association data of the most frequently SNPs investigated in GWA studies are showed in Table 4. The rs12700667 SNP presented a RAF (A) between 20-78% and it was positively associated with endometriosis and advanced disease stage in six studies (Painter *et al.*, 2011, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Uimari *et al.*, 2017, Sapkota *et al.*, 2017). The rs7521902 SNP was identified in 6 studies (Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011,

Pagliardini *et al.*, 2012, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015), however, only Uno *et al.*, 2010 described C as risk allele and others described A as risk allele (Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014 and Sapkota *et al.*, 2015). All articles observed an increased risk of both endometriosis and III and IV stages (Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015). Four studies (Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2017) have reported an association between rs13394619 and endometriosis, however, Nyholt *et al.*, 2012, Sapkota *et al.*, 2015 and Rahmioglu *et al.*, 2014 considered G as risk allele and Sapkota *et al.*, 2017b considered A as risk allele. Only Sapkota *et al.*, 2017b has found a protector effect concerning endometriosis and advanced stage conferred by this polymorphism, while the others observed an increased risk for its development, considering either all cases or only III and IV stage (Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015). The rs1537377 SNP was positively associated with endometriosis and advanced stage of disease in 4 studies (Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2017), with a RAF (C) ranging between 39-44%. Three studies evaluated rs1250248 SNP (Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014), having reported RAF (A) between 3-29% (Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014). These studies observed that patients carrying the variant allele had a higher risk of endometriosis developing, considering both all cases and only III and IV stages of disease. The rs6542095 SNP was reported in three studies, however, Sapkota *et al.*, 2017 described T as risk allele and Adachi *et al.*, 2010 and Sapkota *et al.*, 2015 described C as risk allele. Only Sapkota *et al.*, 2017b found a negative association with endometriosis, while in other studies it was associated with an increased risk for the development of this pathology (Adachi *et al.*, 2010, Sapkota *et al.*, 2015), considering either all cases or only III and IV stage. Three studies have tagged rs7739264 (Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015) with a RAF (T) range between 52-77%. This SNP presented a positive association with endometriosis, considering either all cases or only stage III and IV individuals. The rs7798431 variant was associated with an increased susceptibility to both endometriosis (Painter *et al.*, 2011, Rahmioglu *et al.*, 2014) and advanced stage of disease (Painter *et al.*, 2011) in only two studies, with a RAF (C) between 49-79%. Additionally, two studies (Nyholt *et al.*,

2012, Rahmioglu *et al.*, 2014) have shown a positive association between rs10859871 and endometriosis, and only Painter *et al.*, 2011 also observed this association with III/IV stage of disease, reporting RAF values (C) lying between 29-37%. Regarding rs4141819 SNP, two studies (Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014) have found a positive effect in endometriosis development (with frequencies of the risk allele T ranging from 22% to 34%), considering either all cases or only III and IV stage. Lastly, two studies (Albertsen *et al.*, 2013, Rahmioglu *et al.*, 2014) observed an association between SNP rs6734792 and an increased risk of endometriosis, considering both all cases and III and IV stages of disease.

Discussion

Endometriosis is an estrogen-dependent disease influenced by environmental and genetic factors (Czyzyk *et al.*, 2017). Women with family history of endometriosis have about seven times higher incidence of the disease, in comparison to those without family history (Matalliotakis *et al.*, 2008). Genetic susceptibility of complex diseases, such as endometriosis, has been investigated in GWA studies (Zondervan *et al.*, 2016). To date, 15 GWA studies have been performed on endometriosis (Uno *et al.*, 2010, Adachi *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011, Nyholt *et al.*, 2012, Albertsen *et al.*, 2013, Pagliardini *et al.*, 2013, Rahmioglu *et al.*, 2014, Borghese *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2015, Steinhorsdottir *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016, Uimari *et al.*, 2017, Sapkota *et al.*, 2017, Sapkota *et al.*, 2017b, Sobalska-Kwapis *et al.*, 2017); however, the results are conflicting and have few replication in independent populations (Zondervan *et al.*, 2016). Thus, discuss the gene pathways and SNPs described in GWA studies of endometriosis are relevant to explain the possible causes of conflicting results among these studies in order to understand the endometriosis etiopathogenesis.

Because genes have a heterogeneous structure (untranslated regions, promoters, coding regions and introns), SNPs, depending on their location within or between (intergenic regions) genes, may differently affect the phenotype (Montgomery *et al.*, 2008). In the present study the most of the SNPs identified were located in the intergenic regions (Adachi *et al.*, 2010, Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Nyholt *et al.*, 2012, Albertsen *et al.*, 2013, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, , Uimari *et al.*, 2017, Sapkota *et al.*, 2017a, Sapkota *et al.*, 2017b), and only two SNPs were located in intronic regions (Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012,

Nyholt et al., 2012, Rahmioglu et al., 2014, Sapkota et al., 2015, Sapkota et al., 2017). The majority of GWA studies involving complex diseases have found SNPs in non-coding regions (intronic and intergenic) that can generally affect gene regulation (Maurano et al., 2012; Schaub et al., 2012). Intron SNP can lead to insertions or deletions into the final mRNA transcript, influencing alternative splicing and can result in the loss of function of the translated protein (Maney, 2017). While in the intergenic regions, the SNPs can influence the regulation of transcription through long-range interactions mediated by the formation of chromatin loops. Generally, these SNPs reside in promoters, enhancers and isolators, affecting genes located more than 1 kb upstream or downstream of their target genes (Fung et al., 2015).

Confirmation of GWA studies, that indirectly select SNPs based on linkage disequilibrium, by validation in different populations is crucial to identify true genetic variants that may contribute to understanding the pathogenesis of the disease (Sundqvist, 2013). In addition, it may assist in the discovery of molecular diagnostic tests and in the identification of new pharmacological targets. Current knowledge about the genes pathways and biological functions of the SNPs found in this study, their relevance and influence on endometriosis, as well as its replication and validation studies, is described below.

***IL1A* - rs6542095**

This SNP is located 2.3 kb downstream of *IL1A* (Sapkota et al., 2015b) and encodes IL-1 α , a member of the interleukin-1 cytokine family (Furutani et al., 1986), involved in the regulation of the proinflammatory cytokines and chemokines production, further increasing inflammation (Sharpe et al., 2010). Several studies have reported that endometriotic lesions are characterized by increased serum and peritoneal fluid inflammatory mediators (Hudelist et al., 2005; Yin et al., 2006; Liu et al., 2016). Mardanian and Sheikh-Soleimani observed IL-1 α levels significantly increased in the cervico-vaginal fluid in patients with endometriosis when compared to controls, suggesting this cytokine can be used as endometriosis diagnosis biomarker (Mardanian and Sheikh-Soleimani, 2014). Regarding GWA studies, while Osinski et al. (2018) found no significant results, Sapkota Y et al., 2015 found a positive association between endometriosis and *IL1A* rs6542095 SNP in European and Japanese samples. In addition,

the SNP was positively associated with III/IV stage endometriosis in both populations (Sapkota Y et al., 2015).

***NFE2L3* - rs12700667 and rs7798431**

The rs12700667 and rs7798431 SNPs are located at 290 kb and 331 kb downstream, respectively, of *NFE2L3* gene (Osiński, 2018), responsible for encoding a member of the cap 'n' collar basic-region leucine zipper family of transcription factors (Chevallard and Blank, 2011). This transcription factor has been described as a regulator of cell differentiation, inflammation and carcinogenesis (Chevallard and Blank, 2011). Chowdhury and colleagues showed that NRF3 promotes cancer cell proliferation by p53 degradation through the 20S proteasome (Chowdhury et al., 2017). In addition, *NFE2L3* is highly expressed in different types of cancer tissues, included testis, pancreatic, thyroid, colorectal and breast cancer (Almstrup et al., 2005; Chiu et al., 2005; Rhee et al., 2008; Wang et al., 2017; Wang et al., 2018). Although the role of this gene in the pathogenesis of endometriosis remains unknown, *NFE2L3* rs12700667 was evaluated in two replication and validation studies. Osiński et al. (2018) found that women carrying the rs12700667 variant allele (A) presented a higher risk of developing endometriosis and endometriosis at III/IV stage, whereas Sundqvist et al. (2013) found no association. Only one replication and validation study evaluated the rs7798431 SNP and there was no association (Sundqvist et al., 2013).

***GREB1* - rs13394619**

The rs13394619 SNP on 2p25.1 is located between exons 9 and 10 of *GREB1* gene. This gene is regulated by the estrogen receptor that binds and induces *GREB1* transcription by means of three estrogen response elements (EREs) located approximately to 20 kb upstream of this gene (Sun et al, 2007). *GREB1* is of great importance in hormone-responsive tissues and several cancers (Pellegrini et al., 2012; Cheng et al., 2018; Laviolette et al., 2014). Pellegrini et al., 2012 showed *GREB1* mRNA levels were increased in ectopic tissue of women with endometriosis when compared with both normal and eutopic endometrium, suggesting a key role this gene in estrogen-dependent growth of endometriosis (Pellegrini et al., 2012). Conflicting results were found in GWA studies, while Pagliardini et a., 2012 and Fung et al., 2015 found a

positive association between *GREB1* rs13394619 SNP and endometriosis, Pagliardini et al. (2015) and Osiński et al. (2018) found no significant results.

***FNI* - rs1250248**

The rs1250248 SNP is located between exons 10 and 11 of *FNI* (Pagliardini et al., 2013). This gene encodes a glycoprotein called fibronectin, which is presented in plasma as a soluble dimeric form, and at cell surface and extracellular matrix as a dimeric or multimeric form (Wang, 2017). Fibronectin is involved in cell migration and adhesion processes in the blood coagulation, wound healing, embryogenesis and metastasis (Wang, 2017). Moreover, *FNI* gene has the potential to produce 20 different transcript variants due to alternative splicing; however the function of these variants needs to be further studied (Wang, 2017). *FNI* is known as a fibrotic marker gene and is involved in the fibrogenesis of endometrial and endometriotic tissues (Shao and Wei 2018). Recently, Zhang and colleagues (2019) shown a high expression of fibrotic proteins, such as fibronectin, in ectopic tissue compared to eutopic tissue, and in endometriotic lesions from patients with advanced stage, suggesting a role important of fibronectin in disease etiology. Three replication and validation studies investigated the association between *FNI* rs1250248 SNP and endometriosis. While Sundqvist et al. (2013) and Matalliotakis et al. (2019) found a positive association with endometriosis, Pagliardini et al. 2012 no found association with disease. However, Matalliotakis et al. (2019) observed a positive association with stage I/II endometriosis and Pagliardini et al. 2012 observed a positive association with the ovarian endometrioma.

***WNT4* - rs7521902**

The rs7521902 SNP is located 21 kb upstream of *WNT4* (Albertsen, 2013). The *WNT* gene family is composed by structurally related genes encode secreted signaling proteins that influence oncogenesis and different embryo developmental processes (Jordan et al. 2001). It has been observed that *WNT4* gene is increased in neoplastic tissue compared to normal mammary epithelium (Vouyovitch 2016). Gaetje and colleagues demonstrated *WNT4* is found both in the endometrium, endometriosis and endosalpingiosis (Gaetje et al., 2007). Moreover, our group observed Wnt/ β -catenin pathway was increased in endometriosis rat experimental model, suggesting that this pathway may be a strategy target for clinical treatment of disease, due a role in

induction of angiogenesis (de Mattos et al., 2016). Of the five studies that evaluated *WNT4* rs7521902 SNP with endometriosis risk (Osiński et al., 2018; Matalliotakis M et al., 2017; Mafra F et al., 2015; Sundqvist et al., 2013), Matalliotakis et al. 2017 found a positive association between the heterozygous genotype and III/IV stage endometriosis (Matalliotakis et al. 2017), whereas Pagliardini et al. 201 found a positive association between the variant genotype and advanced stage, ovarian and peritoneal endometriosis (Pagliardini et al. 2012).

***CDKN2B-AS1* - rs1537377**

The rs1537377 SNP is located 48 kb upstream of *CDKN2B-AS1* gene (Osiński, 2018), located within the *CDKN2B-CDKN2A* gene cluster (9p21.3), which is a significant genetic susceptibility locus for several pathologies, such as, cancer and endometriosis (Uno et al., 2010; Congrains et al., 2013). *CDKN2B-AS1* can lead to epigenetic silencing of genes nearby by producing a functional RNA that interacts with the polycomb repressive complex-1 (PRC1) and -2 (PRC2) (Burd, 2010). Several alternatively processed transcript variants have been detected and some of them may generate circular RNA molecules (Burd, 2010). Recently, Wang and colleagues (2019) demonstrated mRNA levels of *CDKN2B-AS1* were upregulated in ovarian cancer cell lines. With silenced gene was observed an inhibition of cell growth, invasion and migration and promotion apoptosis, possibly through miR-411-3p/HIF1a/VEGF/P38 pathway, showing an anti-cancer role of *CDKN2B-AS1*. However, rs1537377 SNP was evaluated only in one replication and validation study with no significant associations with endometriosis (Osiński et al., 2018).

***ID4* - rs7739264**

The rs7739264 SNP is located 52 kb upstream of *ID4* gene, which encodes a protein from the inhibitor of DNA binding (ID) family (Osiński, 2018). Because of its inability of DNA binding, the encoded protein inhibits transcription factors to regulate gene expression (Zhou, 2018). Protein deregulation have a direct effect in initiation, maintenance and cancer progression, besides the drug resistance by through transcriptional events in which the gene may suffer, being considered a possible therapeutic target (Lasorella, 2014). *ID4* was reduced in both ectopic and eutopic tissue samples compared with control samples, suggesting this gene may be a tumor

suppressor (Amirteimouri et al., 2019). No association was found between *ID4* rs7739264 SNP and endometriosis risk (Osiński et al., 2018).

***RND3* - rs6734792**

The rs6734792 is located 280 kb upstream of *RND3* gene, which produces a member of the small GTPase protein superfamily (Rahmioglu, 2014). This protein atypical Rho-GTPase has no GTP hydrolytic activity, and it is believed that it leads to loss of cell adhesion through negative regulation of cytoskeletal organization (Hall, 2012). Moreover, it is known as a general modulator in migration and proliferation of tumor (Hall, 2012). Riou et al (2010) explained that mutations can modify the activity of *RND3*, promoting prostate and breast cancer invasion through its effects on the actin cytoskeleton (Riou et al., 2010). RhoA, known to be antagonized by *RND3*, was gradually increased in normal endometrial stromal cells (ESC), from healthy women and in eutopic ESC (EuESC) and ectopic ESC (EcESC) from endometriosis patients (Wu et al., 2014). These results suggest that Rho GTPase inhibitors may be a new method and means of intervention for endometriosis treatment (Wu et al., 2014). Similar to the *ID4* rs7739264 SNP, no replication and validation study were found with *RND3* rs6734792 SNP and endometriosis.

***VEZT* - rs10859871**

The rs10859871 is located 17 kb upstream of *VEZT* (Pagliardini, 2015). This gene encodes a transmembrane protein localized in adherens junctions that binds to myosin VIIA. *VEZT* gene can produce multiple transcript variants due to alternative splicing and its expression may be inhibited by the linkage between specific microRNA and the 3' UTR of the transcripts (Hyenne, 2007). Recently, Fung and colleagues showed *VEZT* was increased in both expression levels and transcriptional silencing in endometrial tissue samples, suggesting a potential target for development of endometriosis (Fung et al., 2018). Three studies were found regarding *VEZT* rs10859871 SNP (Osiński et al., 2018; Matalliotakis M et al., 2017; Holdsworth-Carson SJ et al., 2016). Matalliotakis et al. (2017) observed heterozygous genotype (rs10859871 AC) was positively associated with endometriosis, whereas Holdsworth-Carson et al. (2016) found association with endometriosis in presence of risk allele (C)

and increase in *VEZT* expression in blood and endometrium. However, Osiński et al. (2018) found no significant results.

***ETAAI* - rs4141819**

ETAAI rs4141819 SNP is located in the intronic region of long noncoding RNA (lncRNA) AC007422.1, where it has a role in regulating gene expression, however the biological function is not yet known (Rahmioglu, 2014). Moreover, *ETAAI* rs4141819 is also located 227 kb upstream of *ETAAI* (Osiński, 2018). Apparently, *ETAAI* gene creates a new repair protein, recruited to stalled forks by RPA (replication protein A) to promote restart of stalled replication forks (Lee, 2016). Borowski and colleagues showed *ETAAI* may function as a tumour-specific cell surface antigen in Ewing's family tumor, and might be used as an additional marker for diagnosis this disease (Borowski et al., 2005). To date no study between the expression of this gene and endometriosis was performed. Only Osiński et al. (2018) replicated *ETAAI* rs4141819 and observed higher risk of developing III/IV stage endometriosis in Polish patients.

Conflicting results from genetic association studies can be explained by selection and number of cases and controls, insufficient power of analyses and heterogeneity of studied populations (Cardoso et al., 2016). In this review, the most of endometriosis cases were diagnosed by surgery (Albertsen et al., 2013; Borghese et al., 2015; Steinhorsdottir et al., 2016; Wang et al., 2016; Uimari et al., 2017; Sobalska-Kwapis et al., 2017) and only Uno et al. 2010 recruited endometriosis patients with multiple clinical symptoms, physical examinations, laparoscopy or imaging tests. This may explain the conflicting results since definitive endometriosis diagnosis is videolaparoscopy with histopathological confirmation (ASRM, 1997; Kennedy et al., 2005). Another important point in case-control study of endometriosis is control selection whereas 11% of endometriosis women are asymptomatic (Moradi et al., 2014). Only 3 studies selected controls through surgery or MRI to confirm the negative diagnosis of endometriosis (Albertsen et al., 2013; Borghese et al., 2015; Wang et al., 2016). In 2016, our group suggested ideal control for association studies in endometriosis susceptibility: (i) women from hospital basis; (ii) without history of infertility and gynecological disorders; (iii) women undergoing tubal ligation (Cardoso et al., 2016).

The number of patients included in each GWA study ranged from 308 (Borghese et al., 2015) to 150,021 (Sapkota et al., 2017b) for the control group and 171 (Sobalska-Kwapis et al., 2017) to 17,045 (Sapkota et al., 2017a) for the endometriosis cases, which may also explain the different results found (Cardoso et al., 2016). Sobalska-Kwapis *et al.* (2017) used 171 endometriosis cases and 2,934 controls, Uimari *et al.*, 2017 used about nineteen time more endometriosis cases and two time more controls than them, and found 22 endometriosis-associated SNPs that were not observed in any of included studies. The number of included individuals needed to achieve statistical power and truly find variants associated with endometriosis may be interfering in the results (Schulz, 2002).

Differences in allelic frequency pattern due to different ethnicity of studied population also can explain the conflicting results. Two studies included only Asian descendants found 5 SNPs associated with endometriosis (Uno et al., 2010; Adachi et al., 2010), while Wang et al. (2016) studied the same population found 14. Regarding European population: 8, 5, 2 and 22 SNPs respectively were associated with endometriosis (Albertsen et al., 2013; Borghese et al., 2015; Steinthorsdottir et al., 2016; Sobalska-Kwapis et al., 2017). Together, women from Asia, Europe and Oceania, it was found 7, 2, 10 and 6 variants, respectively, associated with endometriosis (Nyholt et al., 2012; Pagliardini et al., 2013; Rahmioglu et al., 2014; Sapkota et al., 2015). Sapkota et al. (2017b) and Sobalska-Kwapis et al. (2017) included Oceania, European and American population and both found 22 SNPs associated with endometriosis. However, Sobalska-Kwapis et al. (2017) didn't find the same SNPs associated with disease. In addition, in most GWA studies, a discovery phase with a limited number of samples is initially performed to select the SNPs associated with the trait of interest. Thereafter, to confirm these associations, these SNPs are genotyped at replication stages with a larger number of samples (Pinto et al., 2017). As observed in the present study, 47% of articles performed only one stage and 53% performed both the discovery and replication analyses, which could also be the reason for the different SNPs found in these studies. Thus, it is relevant to obtain data from different populations to validation and replication in future investigations to a better understanding of the genes and SNPs affecting risk to endometriosis development.

Conclusion

Among the SNPs described in this study, the variants *WNT4* rs7521902, *GREB1* rs13394619, *FNI* rs1250248, *ILIA* rs6542095 and *VEZT* rs10859871 stand out for: (i) number of GWA studies with SNPs association with endometriosis; (ii) high frequency of the risk allele in different population; (iii) importance and biological function of genes in the pathogenesis disease; and (iv) SNPs localization.

As noted, the conflicting results found in GWA studies are mainly due to sample size, insufficient power of analysis, selection criteria for cases and controls and differences in allelic frequencies among studied population. Therefore, it is necessary to validate SNPs in independent populations to confirm these associations with endometriosis risk.

Finally, finding SNPs associated with endometriosis risk represents an important advance in understanding the pathogenesis of the disease and thus can help improved the diagnosis and prognosis of the disease, as well as outlining treatment strategies of endometriosis.

Conflict of interest

All the authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Molecular Oncology Group-CI of Portuguese Institute of Oncology (Porto, Portugal), and Mayara Calixto Silva, Isabelle Alves Costa and Matheus Pereira de Mello from State University of West Zone, Rio de Janeiro, Brazil, for their technical assistance. This study was supported by the Brazilian agencies Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ - E-26/203.248/2016) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – 88881.189208/2018-01)

References

- Acien P, Velasco I (2013). Endometriosis: a disease that remains enigmatic. *SRN Obstetric Gynecol* (July):242149.
- Adachi S, Tajima A, Quan J, Haino K, Yoshihara K, Masuzaki H, Katabuchi H, Ikuma K, Suginami H, Nishida N, Kuwano R, Okazaki Y, Kawamura Y, Sasaki T, Tokunaga

K, Inoue I, Tanaka K. Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population.

Albertsen HM, Chettier R, Farrington P, Ward K. Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. *PLoS One*. 2013;8(3):e58257. doi: 10.1371/journal.pone.0058257.

Almstrup, K.; Ottesen, A.M.; Sonne, S.B.; Hoei-Hansen, C.E.; Leffers, H.; Rajpert-De Meyts, E.; Skakkebaek, N.E. Genomic and gene expression signature of the pre-invasive testicular carcinoma in situ. *Cell Tissue Res*. 2005, 322, 159–165.

Amirteimouri S, Ashini M, Ramazanali F, Aflatoonian R, Afsharian P, Shahhoseini M. Epigenetic role of the nuclear factor NF-Y on ID gene family in endometrial tissues of women with endometriosis: a case control study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Mar 15;17(1):32. doi: 10.1186/s12958-019-0476-9.

ASRM - American Society for Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification Of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997.

Baranov VS, Ivaschenko TE, Liehr T, Yarmolinskaya MI. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015 Feb;185:59-65.

Becker CM, Gattrell WT, Gude K, Singh SS. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril*. 2017 Jul;108(1):125-136. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.004.

Benagiano G, Brosens I, Lippi D (2014). The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*.78:1–9.

Borghese B, Tost J, de Surville M, Busato F, Letourneur F, Mondon F, Vaiman D, Chapron C. Identification of susceptibility genes for peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis using a pooled sample-based genome-wide association study. *Biomed Res Int*. 2015;2015:461024. doi: 10.1155/2015/461024.

Borowski A, Dirksen U, Lixin L, Shi RL, Göbel U, Schneider EM. Structure and function of ETAA16: a novel cell surface antigen in Ewing's tumours. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Apr;55(4):363-74.

Borrelli GM, Abrão MS, Mechsner S. Can chemokines be used as biomarkers for endometriosis? A systematic review. *Hum Reprod*. 2014 Feb;29(2):253-66.

Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with

atherosclerosis risk. *PLoS Genet.* 2010 Dec 2;6(12):e1001233. doi: 10.1371/journal.pgen.1001233.

Cardoso JV, Machado DN, Ferrari R, Silva MC, Berardo PT, Perini JA. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, 2016; 16(3), 219-232. <https://dx.doi.org/10.1590/1806-93042016000300002>.

Cheng M, Michalski S, Kommagani R. Role for Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1 (GREB1) in Hormone-Dependent Cancers. *Int J Mol Sci.* 2018 Aug 28;19(9). pii: E2543. doi: 10.3390/ijms19092543.

Chevillard G, Blank V. NFE2L3 (NRF3): the Cinderella of the Cap'n'Collar transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Oct;68(20):3337-48. doi: 10.1007/s00018-011-0747-x.

Chiu, S.T.; Hsieh, F.J.; Chen, S.W.; Chen, C.L.; Shu, H.F.; Li, H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2005, 14, 437–443.

Chowdhury AMMA, Katoh H, Hatanaka A, Iwanari H, Nakamura N, Hamakubo T, Natsume T, Waku T, Kobayashi A. Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation. *Sci Rep.* 2017 Oct 2;7(1):12494. doi: 10.1038/s41598-017-12675-y.

Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 1278-1292; doi:10.3390/ijms14011278.

Czyzyk A, Podfigurna A, Szeliga A, Meczekalski B. Update on endometriosis pathogenesis. *Minerva Ginecol.* 2017 Oct; 69(5):447-461.

Eisenberg VH, Weil C, Chodick G, Shalev V (2018). Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG.* Jan;125(1):55-62. Epub Jun 14.

Facchin F, Barbara G, Saita E, et al (2015). Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 36(4):135-41.

Fung JN, Mortlock S, Girling JE, Holdsworth-Carson SJ, Teh WT, Zhu Z, et al. Genetic regulation of disease risk and endometrial gene expression highlights potential target

genes for endometriosis and polycystic ovarian syndrome. *Sci Rep*. 2018 Jul 30;8(1):11424. doi: 10.1038/s41598-018-29462-y.

Fung JN, Rogers PA, Montgomery GW. Identifying the biological basis of GWAS hits for endometriosis. *Biol Reprod*. 2015 Apr;92(4):87. doi: 10.1095/biolreprod.114.126458.

Furutani Y, Notake M, Fukui T, Ohue M, Nomura H, Yamada M, Nakamura S. Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res*. 1986 Apr 25;14(8):3167-79.

Gaetje R, Holtrich U, Engels K, Kissler S, Rody A, Karn T, Kaufmann M. Endometriosis may be generated by mimicking the ontogenetic development of the female genital tract. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):651-6.

Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*. 40:1378-1382.

Hansen KA, Eyster KM. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol*. 2010 Jun;53(2):403-12.

Holdsworth-Carson SJ, Fung JN, Luong HT, Sapkota Y, Bowdler LM, Wallace L, et al. Endometrial vezatin and its association with endometriosis risk. *Hum Reprod*. 2016 May;31(5):999-1013. doi: 10.1093/humrep/dew047.

Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, Mueller R, Czerwenka K, Kubista E, Singer CF. Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1695-701.

Hyenne V, Harf JC, Latz M, Maro B, Wolfrum U, Simmler MC. Vezatin, a ubiquitous protein of adherens cell-cell junctions, is exclusively expressed in germ cells in mouse testis. *Reproduction*. 2007 Mar;133(3):563-74.

Jiang L, Yan Y, Liu Z, Wang Y. Inflammation and endometriosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016 Jun 1;21:941-8.

Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet*. 2001 May;68(5):1102-9.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704.

- Koltermann KC, Schlotmann A, Schröder H, Willich SN, Reinhold T (2016). Economic burden of deep infiltrating endometriosis of the bowel and the bladder in Germany: The statutory health insurance perspective. *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitswes.* Dec;118-119:24-30.
- Lasorella A, Benezra R, Iavarone A. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer.* 2014 Feb;14(2):77-91. doi: 10.1038/nrc3638.
- Laviolette LA, Hodgkinson KM, Minhas N, Perez-Iratxeta C, Vanderhyden BC. 17 β -estradiol upregulates GREB1 and accelerates ovarian tumor progression in vivo. *Int J Cancer.* 2014 Sep 1;135(5):1072-84. doi: 10.1002/ijc.28741.
- Lee YC, Zhou Q, Chen J, Yuan J. RPA-Binding Protein ETAA1 Is an ATR Activator Involved in DNA Replication Stress Response. *Curr Biol.* 2016 Dec 19;26(24):3257-3268. doi: 10.1016/j.cub.2016.10.030.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ.* 2009 Jul 21;339:b2700. doi: 10.1136/bmj.b2700.
- MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D896-D901.
- Mafra F, Catto M, Bianco B, Barbosa CP, Christofolini D. Association of WNT4 polymorphisms with endometriosis in infertile patients. *J Assist Reprod Genet.* 2015 Sep;32(9):1359-64. doi: 10.1007/s10815-015-0523-1.
- Maney DL. Polymorphisms in sex steroid receptors: From gene sequence to behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2017 Oct;47:47-65. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.07.003.
- Mardanian F, Sheikh-Soleimani Z. The diagnostic role of cervico-vaginal fluid interleukins-1 α in endometriosis: A case-control study. *J Res Med Sci.* 2014 Dec;19(12):1145-9.
- Matalliotaki C, Matalliotakis M, Rahmioglu N, Mavromatidis G, Matalliotakis I, Koumantakis G, Zondervan K, Spandidos DA, Goulielmos GN, Zervou MI. Role of FN1 and GREB1 gene polymorphisms in endometriosis. *Mol Med Rep.* 2019 Jul;20(1):111-116. doi: 10.3892/mmr.2019.10247.
- Matalliotakis IM, et al. Familial aggregation of endometriosis in the Yale Series. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2008 278, 507–511.

Matalliotakis M, Zervou MI, Matalliotaki C, Rahmioglu N, Koumantakis G, Kalogiannidis I, Prapas I, Zondervan K, Spandidos DA, Matalliotakis I, Goulielmos GN. The role of gene polymorphisms in endometriosis. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):5881-5886. doi: 10.3892/mmr.2017.7398.

Mattos RM, Machado DE, Perini JA, Alessandra-Perini J, Meireles da Costa NO, Wiecekowski AFDRO, Cabral KMDS, Takiya CM, Carvalho RS, Nasciutti LE. Galectin-3 plays an important role in endometriosis development and is a target to endometriosis treatment. *Mol Cell Endocrinol.* 2019 Apr 15;486:1-10. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.007.

Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* 2012; 337:1190–1195.

Moradi M, Parker M, Sneddon A, Lopez V, Ellwood D. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health.* 2014 Oct 4;14:123. doi: 10.1186/1472-6874-14-123.

Nyholt DR, Low SK, Anderson CA, Painter JN, Uno S, Morris AP, MacGregor S, Gordon SD, Henders AK, Martin NG, Attia J, Holliday EG, McEvoy M, Scott RJ, Kennedy SH, Treloar SA, Missmer SA, Adachi S, Tanaka K, Nakamura Y, Zondervan KT, Zembutsu H, Montgomery GW. Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1355-9. doi: 10.1038/ng.2445.

Osiński M, Mostowska A, Wirstlein P, Wender-Ożegowska E, Jagodziński PP, Szczepańska M. The assessment of GWAS - identified polymorphisms associated with infertility risk in Polish women with endometriosis. *Ginekol Pol.* 2018;89(6):304-310. doi: 10.5603/GP.a2018.0052.

Pagliardini L, Gentilini D, Sanchez AM, Candiani M, Viganò P, Di Blasio AM. Replication and meta-analysis of previous genome-wide association studies confirm vezatin as the locus with the strongest evidence for association with endometriosis. *Hum Reprod.* 2015 Apr;30(4):987-93. doi: 10.1093/humrep/dev022.

Pagliardini L, Gentilini D, Viganò P, Panina-Bordignon P, Busacca M, Candiani M, Di Blasio AM. An Italian association study and meta-analysis with previous GWAS confirm WNT4, CDKN2BAS and FN1 as the first identified susceptibility loci for

endometriosis. *J Med Genet.* 2013 Jan;50(1):43-6. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101257.

Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, Macgregor S, Lin J, Lee SH, Lambert A, Zhao ZZ, Roseman F, Guo Q, Gordon SD, Wallace L, Henders AK, Visscher PM, Kraft P, Martin NG, Morris AP, Treloar SA, Kennedy SH, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet.* 2011 Jan;43(1):51-4. doi: 10.1038/ng.731.

Pellegrini C, Gori I, Ahtari C, Hornung D, Chardonnens E, Wunder D, Fiche M, Canny GO. The expression of estrogen receptors as well as GREB1, c-MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98(5):1200-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.056.

Pinto R, Assis J, Nogueira A, Pereira C, Pereira D, Medeiros R. Rethinking ovarian cancer genomics: where genome-wide association studies stand? *Pharmacogenomics.* 2017 Nov;18(17):1611-1625. doi: 10.2217/pgs-2017-0108.

Rahmioglu N, Nyholt DR, Morris AP, Missmer SA, Montgomery GW, Zondervan KT. Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Hum Reprod Update.* 2014 Sep-Oct;20(5):702-16. doi: 10.1093/humupd/dmu015.

Rhee, D.K.; Park, S.H.; Jang, Y.K. Molecular signatures associated with transformation and progression to breast cancer in the isogenic MCF10 model. *Genomics* 2008, 92, 419–428.

Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays.* 2010;32(11):986–992.

Sapkota Y, Fassbender A, Bowdler L, Fung JN, Peterse D, O D, Montgomery GW, Nyholt DR, D'Hooghe TM. Independent Replication and Meta-Analysis for Endometriosis Risk Loci. *Twin Res Hum Genet.* 2015 Oct;18(5):518-25. doi: 10.1017/thg.2015.61.

Sapkota Y, Low SK, Attia J, Gordon SD, Henders AK, Holliday EG, MacGregor S, et al. Association between endometriosis and the interleukin 1A (IL1A) locus. *Hum Reprod.* 2015 Jan;30(1):239-48. doi: 10.1093/humrep/deu267.

Sapkota Y, Steinthorsdottir V, Morris AP, Fassbender A, Rahmioglu N, De Vivo I, Buring JE, et al. Meta-analysis identifies five novel loci associated with endometriosis

highlighting key genes involved in hormone metabolism. *Nat Commun.* 2017a May 24;8:15539. doi: 10.1038/ncomms15539.

Sapkota Y, Vivo I, Steinhorsdottir V, Fassbender A, Bowdler L, Buring JE, Edwards TL, Jones S, et al. Analysis of potential protein-modifying variants in 9000 endometriosis patients and 150000 controls of European ancestry. *Sci Rep.* 2017b Sep 12;7(1):11380. doi: 10.1038/s41598-017-10440-9.

Schaub MA, Boyle AP, Kundaje A, Batzoglou S, Snyder M. Linking disease associations with regulatory information in the human genome. *Genome Res* 2012; 22:1748–1759.

Schulz KF, Grimes DA. Case-control studies: research in reverse. *Lancet.* 2002 Feb 2;359(9304):431-4.

Shao X, Wei X. FOXP1 enhances fibrosis via activating Wnt/ β -catenin signaling pathway in endometriosis. *Am J Transl Res.* 2018 Nov 15;10(11):3610-3618.

Sharpe-Timms KL, Nabli H, Zimmer RL, Birt JA, Davis JW. Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2010 May;25(5):1241-50. doi: 10.1093/humrep/deq032.

Sobalska-Kwapis M, Smolarz B, Słomka M, Szaflik T, Kępka E, Kulig B, Siewierska-Górska A, Polak G, Romanowicz H, Strapagiel D, Szyłło K. New variants near RHOJ and C2, HLA-DRA region and susceptibility to endometriosis in the Polish population-The genome-wide association study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017 Oct;217:106-112. doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.08.037.

Steinhorsdottir V, Thorleifsson G, Aradottir K, Feenstra B, Sigurdsson A, Stefansdottir L, Kristinsdottir AM, Zink F, Halldorsson GH, Munk Nielsen N, Geller F, Melbye M, Gudbjartsson DF, Geirsson RT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Common variants upstream of KDR encoding VEGFR2 and in TTC39B associate with endometriosis. *Nat Commun.* 2016 Jul 25;7:12350. doi: 10.1038/ncomms12350.

Sun J, Nawaz Z, Slingerland JM. Long-range activation of GREB1 by estrogen receptor via three distal consensus estrogen-responsive elements in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2007 Nov;21(11):2651-62.

Sundqvist J, Xu H, Vodolazkaia A, Fassbender A, Kyama C, Bokor A, Gemzell-Danielsson K, D'Hooghe TM, Falconer H. Replication of endometriosis-associated single-nucleotide polymorphisms from genome-wide association studies in a Caucasian population. *Hum Reprod.* 2013 Mar;28(3):835-9. doi: 10.1093/humrep/des457.

- Uimari O, Rahmioglu N, Nyholt DR, Vincent K, Missmer SA, Becker C, Morris AP, Montgomery GW, Zondervan KT. Genome-wide genetic analyses highlight mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod.* 2017 Apr 1;32(4):780-793. doi: 10.1093/humrep/dex024.
- Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A, Kubo M, Akahane T, Aoki D, Kamatani N, Hirata K, Nakamura Y. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):707-10. doi: 10.1038/ng.612.
- Vercellini P, Buggio L, Berlanda N, Barbara G, Somigliana E, Bosari S. Estrogen-progestins and progestins for the management of endometriosis. *Fertil Steril.* 2016 Dec;106(7):1552-1571.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.022.
- Vercellini P, Viganò P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, Milan, 2013; v.10, n.5, p.261-75.
- von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg.* 2014 Dec;12(12):1495-9.
- Vouyovitch CM, Perry JK, Liu DX, Bezin L, Vilain E, Diaz JJ, Lobie PE, Mertani HC. WNT4 mediates the autocrine effects of growth hormone in mammary carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Jul;23(7):571-85. doi: 10.1530/ERC-15-0528.
- Wang W, Li Y, Li S, Wu Z, Yuan M, Wang T, Wang S. Pooling-Based Genome-Wide Association Study Identifies Risk Loci in the Pathogenesis of Ovarian Endometrioma in Chinese Han Women. *Reprod Sci.* 2017 Mar;24(3):400-406. doi: 10.1177/1933719116657191.
- Wang Y, Huang Y, Liu H, Su D, Luo F, Zhou F. Long noncoding RNA CDKN2B-AS1 interacts with miR-411-3p to regulate ovarian cancer in vitro and in vivo through HIF-1a/VEGF/P38 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Jun 18;514(1):44-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.141.
- Wang, C.; Saji, M.; Justiniano, S.E.; Yusof, A.M.; Zhang, X.; Yu, L.; Fernández, S.; Wakely, P., Jr.; La Perle, K.; Nakanishi, H.; et al. RCAN1-4 is a thyroid cancer growth and metastasis suppressor. *J. Clin. Investig. Insight* 2017, 2, e90651.

- Wang, H.; Zhan, M.; Yang, R.; Shi, Y.; Liu, Q.; Wang, J. Elevated expression of NFE2L3 predicts the poor prognosis of pancreatic cancer patients. *Cell Cycle* 2018, 17, 2164–2174.
- Wu ZY, Yang XM, Cheng MJ, Zhang R, Ye J, Yi H, Ao JP, Zhang ZG, Xu CJ. Dysregulated cell mechanical properties of endometrial stromal cells from endometriosis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jan 15;7(2):648-55.
- Yin LR, Sun JJ, Ma HD, Mi SL, Guo SJ, Shi Y. [Expression of interleukin1-alpha, beta and interferon-gamma in macrophages from endometrium of women with endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006 May;41(5):295-8.
- Zhang Z, Suo L, Chen Y, Zhu L, Wan G, Han X. Endometriotic Peritoneal Fluid Promotes Myofibroblast Differentiation of Endometrial Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019 Jun 2;2019:6183796. doi: 10.1155/2019/6183796.
- Zhou XL, Zeng, Ye YH, Sun SM, Lu XF, Liang WQ, Chen CF, Lin HY. Prognostic values of the inhibitor of DNA-binding family members in breast cancer. *Oncol Rep*. 2018 Oct;40(4):1897-1906. doi: 10.3892/or.2018.6589.
- Zondervan KT, Rahmioglu N, Morris AP, Nyholt DR, Montgomery GW, Becker CM, Missmer SA. Beyond Endometriosis Genome-Wide Association Study: From Genomics to Phenomics to the Patient. *Semin Reprod Med*. 2016 Jul;34(4):242-54. doi: 10.1055/s-0036-1585408.

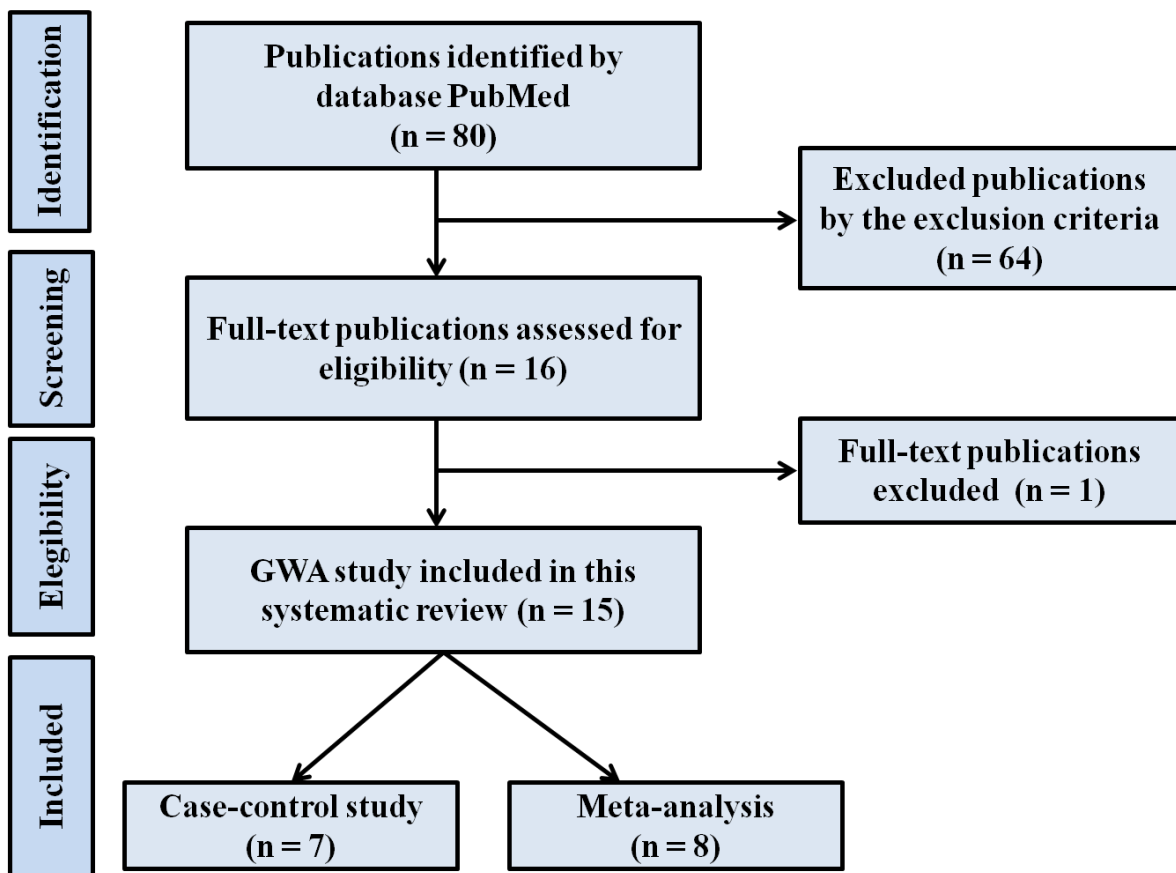


Figure 1. Flow chart of GWA studies included in this systematic review.

Table 1. Baseline characteristics of GWA studies included in this systematic review.

Reference	Study type	Ethnicity	Stage of study	Controls (N)	Cases (N)	Associated SNPs (N)	Quality control ^j	Quality scores (%) ^k
Uno <i>et al.</i> , 2010	Case-control of hospital base	Asian	Discovery and replication	1318 and 3974	1423 and 484	5	Yes	77%
Adachi <i>et al.</i> , 2010	Meta-analysis ^a of population and hospital base	Asian	GWA	825 (262 and 563) ^a	696 (290 and 406) ^a	5	Yes	85%
Painter <i>et al.</i> , 2011	Meta-analysis ^b of population and hospital base	Oceania and European	Discovery and replication	7060	3194 and 2392	3	Yes	82%
Nyholt <i>et al.</i> , 2012	Meta-analysis ^c of population and hospital base	Asian / Oceania and European	Discovery and replication	9393 and 1044	4604 and 4017	7	Yes	81%
Pagliardini <i>et al.</i> , 2012	Meta-analysis ^d of population and hospital base	Asian / European	GWA	2710	305	2	Yes	81%
Albertsen <i>et al.</i> , 2013	Case-control of Population base	European ⁱ	Discovery and replication	14471 (12660 and 1811)	2019 (1514 and 505)	8	Yes	95%
Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014	Meta-analysis ^e of population and hospital base	American, European, Oceania	GWA	11506	32678	10	Yes	85%
Borghese <i>et al.</i> , 2015	Case-control of hospital base	European	Discovery and replication	308 (20 and 288)	319 (60 and 259)	5	Yes	100%

Sapkota <i>et al.</i> , 2015	Meta-analysis ^f of population and hospital base	Asian / African / Oceania and European ⁱ	replication Discovery and replication GWA	1077	900	6	Yes	81%
Steinthorsdottir <i>et al.</i> , 2016	Case-control of hospital base	European	(Iceland and Denmark) Discovery and replication	129016 and 749	1840 and 514	3	No	91%
Wang <i>et al.</i> , 2016	Case-control of hospital base	Asian	Discovery and replication	50 and 1490	50 and 1448	14	Yes	100%
Sapkota <i>et al.</i> , 2017a	Meta-analysis ^g of population and hospital base	Asian / Oceania and European/American	GWA	191596	17045	13	Yes	89%
Uimari <i>et al.</i> , 2017	Case-control of population and hospital base	Oceania and European	GWA	7060	3194	6	Yes	100%
Sapkota <i>et al.</i> , 2017b	Meta-analysis ^h of population and hospital base	Oceania and European/American	Discovery and replication	150021 (21005 and 129016)	9004 (7164 and 1840)	22	Yes	81%
Sobalska-Kwapis <i>et al.</i> , 2017	Case-control of population and hospital base	European	GWA	2934	171	22	Yes	100%

N = number.

^a datasets from two case-control cohorts genotyped with the Affymetrix Mapping 500K Array or Genome-Wide Human SNP Array 6.0, respectively.

^b Two individual cohorts namely QIMR-Australia and Oxford-UK participated of this study.

^c datasets from Uno *et al.*, 2010 and Painter *et al.*, 2011.

^d datasets from Adachi *et al.*, 2010 and Painter *et al.*, 2011.

^e datasets from four case-control GWA cohorts (Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011, Albertsen *et al.*, 2013 and Pagliardini *et al.*, 2013) and four replication studies (Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011b, Pagliardini *et al.*, 2013 and Sundqvist *et al.*, 2013).

^f datasets from Painter *et al.*, 2011, Nyholt *et al.*, 2012, Albertsen *et al.*, 2013 and Sapkota *et al.*, 2015 (replication study).

^g Eleven individual cohorts namely QIMRHCS, LEUVEN, deCODE, NHS2-dbGaP, OX, 23andMe, WGHS, BBJ, Adachi-6, Adachi-500K and iPSYCH participated of this study.

^h Six individual cohorts namely QIMR-Australia, LEUVEN-Belgium, NHS2-USA, BioVU-USA, WGHS-USA and iPSYCH-Denmark participated of this study.

ⁱ There is a preponderance of women having ancestral roots in the north-western part of Europe with a Southern trend towards Italy. For more details visit to the website: <http://www.endtoendo.com>.

^j Careful and thorough evaluation of data quality to reduce the rate of false-positive and false-negative results.

^k based on the checklist STROBE for case-control studies and on the checklist PRISMA for meta-analysis studies.

Table 2. Diagnosis/selection characteristics of the GWA case-control studies included in this systematic review.

References	Endometriosis diagnosis	Stages of endometriosis	Controls selection
Uno <i>et al.</i> , 2010	Multiple clinical symptoms, physical examinations, laparoscopy or imaging tests.	No	Individuals with diseases other than endometriosis (18 diseases)
Albertsen <i>et al.</i> , 2013	Surgery ^c	Yes	Laparotomy or laparoscopic or MRI
Borghese <i>et al.</i> , 2015 ^a	Surgery	Yes	Surgery
Steinhorsdo ttir <i>et al.</i> , 2016	Laparotomy or laparoscopic	Yes	With no history of endometriosis diagnosed
Wang <i>et al.</i> , 2016 ^b	Laparoscopy or laparotomy.	Yes	Laparoscopy or laparotomy
Uimari <i>et al.</i> , 2017	Laparoscopy or laparotomy	Yes	With no history of endometriosis diagnosed
Sobalska-Kwapis <i>et al.</i> , 2017	Laparoscopy or laparotomy	Yes	Women declared themselves as a healthy and with no evidence of current endometriosis disease stage.

MRI = Magnetic resonance image

^a Borghese *et al.*, 2015 included data on superficial endometriosis (SUP), ovarian endometrioma (OMA) and deep infiltrative endometriosis (DIE) in their analyzes.

^b Wang *et al.*, 2016 included only women with OMA in their analyzes.

^c Laparoscopy was preferred method used in this study.

Table 3. Characteristics of the most frequently investigated polymorphisms in the GWA studies.

Chr ^a	dbSNP ID	Position (bp) ^b	SNP location	Gene (distance) ^c	References ^d
1p36.12	rs7521902	22490474	Intergenic	<i>WNT4</i> upstream (21 Kb)	Uno <i>et al.</i> , 2010, Painter <i>et al.</i> , 2011, Pagliardini <i>et al.</i> , 2012, Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014, Sapkota <i>et al.</i> , 2015.
2p25.1	rs13394619	11727257	Intronic, between 9 and 10 exon	<i>GREB1</i>	Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014, Sapkota <i>et al.</i> , 2015, Sapkota <i>et al.</i> , 2017a.
2q35	rs1250248	216286843	Intronic, between 10 and 11 exon	<i>FNI</i>	Painter <i>et al.</i> , 2011, Pagliardini <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014.
2q13	rs6542095	113529183	Intergenic	<i>IL1A</i> downstream (2.3 Kb)	Adachi <i>et al.</i> , 2010, Sapkota <i>et al.</i> , 2015, Sapkota <i>et al.</i> , 2017b.
2p14	rs4141819	67864675	Intergenic	<i>ETAA1</i> upstream (227 kb)	Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014.
2q23.3	rs6734792	151624632	Intergenic	<i>RND3</i> upstream (280 kb)	Albertsen <i>et al.</i> , 2013, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014.
6p22.3	rs7739264	19785588	Intergenic	<i>ID4</i> upstream (52 Kb)	Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014, Sapkota <i>et al.</i> , 2015.
7p15.2	rs12700667	25901639	Intergenic	<i>NFE2L3</i> downstream (290 Kb)	Painter <i>et al.</i> , 2011, Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014, Sapkota <i>et al.</i> , 2015, Uimari <i>et al.</i> , 2017, Sapkota <i>et al.</i> , 2017b.
7p15.2	rs7798431	25860562	Intergenic	<i>NFE2L3</i> downstream (331 Kb)	Painter <i>et al.</i> , 2011, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014.
9p21.3	rs1537377	22169450	Intergenic	<i>CDKN2B-AS1</i> upstream (48 Kb)	Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014, Sapkota <i>et al.</i> , 2015, Sapkota <i>et al.</i> , 2017a.
12q22	rs10859871	95711626	Intergenic	<i>VEZT</i> upstream (17Kb)	Nyholt <i>et al.</i> , 2012, Rahmioglu <i>et al.</i> , 2014.

^a SNPs were distributed by chromosomal location.

^b Genomic position is shown relative to GRCh37 (hg19).

^c Distance of SNPs to the gene when relevant.

^d Studies in which each SNP was associated with endometriosis.

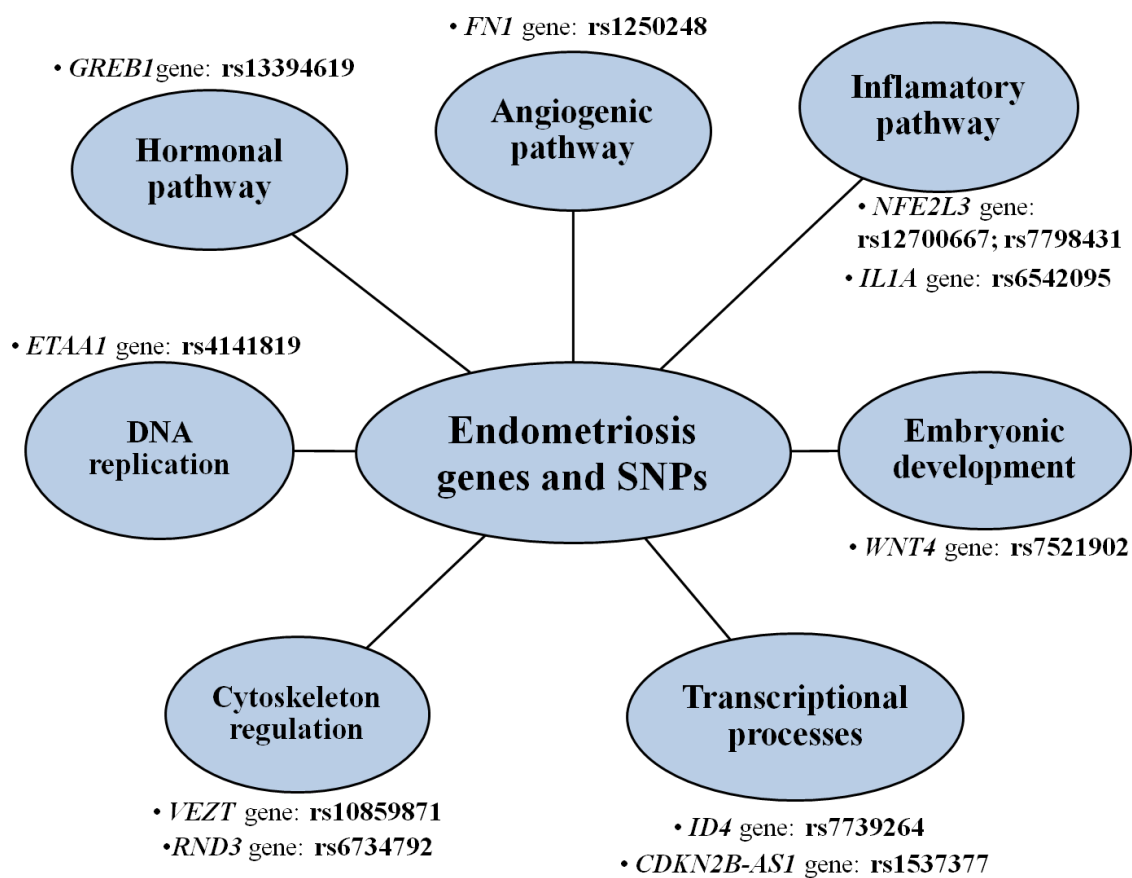


Figure 2. Molecular pathways and SNPs associated with endometriosis susceptibility.

Table 4. Summary of the minor allelic frequency data and of the association results of GWA studies included in this systematic review.

Gene	dbSNP ID	RAF	Association data		Number of studies ^f
			All cases	Stage III/IV	
<i>NFE2L3</i> downstream	rs12700667	0.20 – 0.78	Risk (A)	Risk (A)	6 ^g
<i>WNT4</i> upstream	rs7521902	0.20 – 0.57 (A) and 0.56 (C ^a)	Risk (A and C)	Risk (A and C)	6 ^h
<i>GREB1</i>	rs13394619	0.42 – 0.49 (G) and 0.48 (A ^b)	Risk (G) and Protection ^d (A)	Risk (G) and Protection ^d (A)	4 ⁱ
<i>CDKN2B- AS1</i>	rs1537377	0.39 – 0.44 (C)	Risk (C)	Risk (C)	4 ^j
<i>FNI</i>	rs1250248	0.03 – 0.30 (A)	Risk (A)	Risk (A)	3 ^k
<i>IL1A</i> downstream	rs6542095	0.32 – 0.80 (C) and 0.69 (T ^c)	Risk (C) and Protection ^d (T)	Risk (C) and Protection ^d (T)	3 ^l
<i>ID4</i> upstream	rs7739264	0.52 – 0.77 (T)	Risk (T)	Risk (T)	3 ^m
<i>NFE2L3</i> downstream	rs7798431	0.49 – 0.79 (C)	Risk (C)	Risk (C) ^e	2 ⁿ
<i>VEZT</i> upstream	rs10859871	0.29 – 0.37 (C)	Risk (C)	Risk (C) ^e	2 ^o
<i>ETAA1</i> downstream	rs4141819	0.22 – 0.34 (C)	Risk (C)	Risk (C)	2 ^p
<i>RND3</i> downstream	rs6734792	0.32 – 0.45 (C)	Risk (C)	Risk (C)	2 ^q

RAF = Risk allele frequency

^a Uno *et al.*, 2010 describe C as risk allele.

^b only Rahmioglu *et al.*, 2014 describes G as risk allele.

^c only Sapkota *et al.*, 2017b describes T as risk allele.

^d only Sapkota *et al.*, 2017b found a protector effect against endometriosis.

^e only Painter *et al.*, 2011 found higher risk of advanced endometriosis developing.

^f Number of studies that found an association between the respective SNP and endometriosis.

^g Painter *et al.*, 2011, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Uimari *et al.*, 2017, Sapkota *et al.*, 2017a.

^h Uno *et al.*, 2010, Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015.

ⁱ Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2017b.

^j Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2017a.

^k Painter *et al.*, 2011, Pagliardini *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014.

^l Adachi *et al.*, 2010, Sapkota *et al.*, 2015, Sapkota *et al.*, 2017b.

^m Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014, Sapkota *et al.*, 2015.

- ⁿ Painter *et al.*, 2011, Rahmioglu *et al.*, 2014.
^o Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014.
^p Nyholt *et al.*, 2012, Rahmioglu *et al.*, 2014.
^q Albertsen *et al.*, 2013, Rahmioglu *et al.*, 2014.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese foi desenvolvida com o intuito de contribuir no entendimento da etiologia da endometriose e na identificação dos fatores de risco genéticos e ambientais associados ao desenvolvimento da doença. Neste sentido foi avaliada uma amostra de mulheres atendidas em três hospitais da rede pública do Rio de Janeiro (HFSE, HFL e HMF) e um hospital da rede pública de São Paulo (HC-FMUSP) no período de 2011 a 2018, além de uma vasta revisão da literatura sobre os possíveis aspectos epidemiológicos e genéticos associados com a endometriose.

Apesar de existirem inúmeros estudos que avaliaram a associação entre a endometriose e fatores demográficos, hábitos pessoais, variações menstruais, reprodutivos e fatores genéticos, a fisiopatologia da doença permanece um enigma e o aconselhamento adequado para as pacientes em relação ao prognóstico ainda é desafiador. Diante disso, esta tese descreveu as características epidemiológicas de uma amostra de mulheres brasileiras da região sudeste com endometriose, revelando que a maioria delas estavam em idade reprodutiva, apresentavam IMC normal (IMC 18,4-24,9) e uma alta frequência de todos os sintomas clínicos da doença. Considerando o número de sintomas de dor ginecológica, um terço das mulheres relataram ter dismenorreia, dor pélvica crônica e dispareunia e um quarto relataram ter dismenorreia e dispareunia. Além disso, a infertilidade foi observada em mais da metade das mulheres (CARDOSO *et al.*, 2020 - submetido).

Este estudo também determinou a associação entre os valores prognósticos (classificação e estadiamento da endometriose), diagnósticos (cirurgia ou RNM) e sintomas da doença com as características epidemiológicas, mostrando que os sintomas dismenorreia e dor pélvica crônica não cíclica foram associadas ao ciclo menstrual irregular. Enquanto que, a dispareunia profunda foi associada com o IMC >25, consumo de álcool e endometriose superficial. Pacientes com endometriose profundada e infiltrativa (EPI) foram associados com maior escolaridade e tabagismo. Ademais, EPI e estágio III-IV foram associados com o sintoma de alterações intestinais cíclicas e maior tempo de diagnóstico. Mulheres com idade de 30 à 39,9 anos foram associadas à infertilidade. A dismenorreia, alterações intestinais cíclicas e infertilidade também foram associadas com alguns locais da endometriose (ligamento uterosacro, retosigmoide, intestino e tubas uterinas). Mulheres com estágios III-IV de endometriose também eram mais propensas a se casarem e praticar alguma atividade física, enquanto que, aquelas com EPI apresentaram maior nível de educação e menos chance de fumar. Além disso, as mulheres diagnosticadas por imagem apresentaram uma idade

significativamente mais jovem e eram mais propensas a serem solteiras e com alta paridade, em comparação com as diagnosticadas por cirurgia (CARDOSO *et al.*, 2020 - submetido). Estes dados representam uma ferramenta importante e fornece informações valiosas em relação ao perfil de mulheres brasileiras com esta doença, sendo possível determinar diretrizes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e tratamento da endometriose.

Como a endometriose é considerada uma doença dependente de estrogênio e fatores genéticos podem influenciar no seu desenvolvimento, esta tese focou na análise de SNPs em genes envolvidos com a síntese e metabolismo do estrogênio. Os resultados das análises envolvendo os SNPs *PGR +331C>T*, *CYP17A1 -34A>G* e *CYP19A1 1531G>A* sugerem uma interação gene-gene na suscetibilidade à endometriose, podendo ser considerados alvos moleculares para o diagnóstico e/ou prognóstico da doença, e até um possível tratamento individualizado para as mulheres com endometriose (CARDOSO *et al.*, 2017a).

Em relação aos SNPs *CYP2C19*2* e *CYP2C19*17*, foi observado uma associação positiva com a endometriose na presença do *CYP2C19*2*, considerando todos os casos e apenas casos de EPI. Além disso, como o estrogênio também é produzido pelos adipócitos e a relação do IMC das mulheres com endometriose permanece um enigma, este artigo hipotetizou que os SNPs do gene *CYP2C19* poderiam alterar os níveis circulantes de estrogênio e modificar o risco de endometriose influenciado pelo IMC. Assim, foi observado que entre as mulheres obesas (IMC 30-40), o SNP *CYP2C19*2* foi associado com a endometriose, sugerindo que o IMC pode ter uma interação significativa com o SNP *CYP2C19*2* e o risco de endometriose (CARDOSO *et al.*, 2017b).

Os focos de endometriose são dependentes da angiogênese, na qual envolve o remodelamento matriz extracelular pela ação das MMPs, sendo a MMP-3 a enzima com um papel crucial nesse processo. Como o gene *MMP-3* é altamente polimórfico, este estudo também investigou o papel do SNP *MMP-3 276G>A* como fator de risco para o desenvolvimento da doença e seus sintomas porque este SNP provoca mudanças conformacionais na proteína, tornando a ativação autocatalítica rápida para gerar uma enzima ativa. A partir dos resultados encontrados, foi sugerido que o SNP *MMP-3 276G>A* está associado com os casos III-IV de endometriose e a infertilidade relacionada à doença (CARDOSO *et al.*, 2019). Entretanto, mais estudos que avaliem a relação deste SNP com a expressão do gene no tecido endometrial são ainda necessários para confirmar se o SNP *MMP-3 276G>A* pode ser considerado um marcador molecular, podendo auxiliar no diagnóstico e/ou prognóstico da endometriose.

O presente estudo foi o primeiro que investigou a relação entre os valores prognósticos, diagnósticos e sintomas da endometriose e suas características epidemiológicas em uma coorte de mulheres atendidas em dois centros especializados do Rio de Janeiro de diagnóstico e tratamento da endometriose. Além disso, foi o primeiro estudo na população brasileira que avaliou os SNPs *PGR +331C>T*, *CYP17A1 -34A>G*, *CYP19A1 1531G>A*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17* e *MMP-3 276G>A* na suscetibilidade da endometriose, considerando as variáveis clínicas (estadiamento e classificação da endometriose e os sintomas clínicos da doença) e antropométrica (status do IMC). Outro ponto forte do nosso estudo foi a inclusão do grupo controle de mulheres com diagnóstico cirúrgico negativo para endometriose, excluindo a presença de endometriose assintomática. Entretanto, o grupo controle também incluiu pacientes com outras doenças ginecológicas, podendo fornecer menores estimativas de risco se elas também estiverem associadas com os SNPs estudados. A maioria dos casos de endometriose foram diagnosticada por laparoscopia ou laparotomia que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da doença. No entanto, 37% dos casos foram diagnosticadas por ressonância magnética, que também tem sido descrito como um método preciso para a detecção de endometriose profunda por sua alta especificidade e sensibilidade. Mesmo que o tempo de recrutamento da presente tese tenha sido de 7 anos e em hospitais de referência no diagnóstico e tratamento da endometriose, o diagnóstico da doença é um desafio e, portanto, longo, sendo ainda necessário um tamanho de amostra maior para detectar outras associações e fornecer mais confiança nas descobertas. Além disso, como essa tese se trata de um estudo observacional, é possível que ainda existam variáveis não medidas, o que proíbe a exclusão completa de possíveis confundimentos residuais. No entanto, esse viés é mínimo, dado o ajuste por muitos fatores de confusão realizado nos artigos. Um viés de referência também deve ser levado em consideração, uma vez que as pacientes incluídas neste estudo são tratadas em instituições de referência para endometriose. Essas mulheres podem apresentar sintomatologia mais grave, e provavelmente foram encaminhadas para esses centros, enviesando os resultados.

Por fim, como a endometriose é considerada uma doença complexa e heterogênea, no qual fatores extrínsecos e intrínsecos, como o perfil genético, podem contribuir para o seu desenvolvimento, foi realizado uma revisão sistemática dos estudos de GWA com endometriose, a fim de descrever os genes e os SNPs associados à doença, além de discutir possíveis vieses dos resultados conflitantes entre esses estudos. Este artigo faz parte dos resultados obtidos no Doutorado sanduíche realizado entre novembro/2018 e abril/2019 no Laboratório de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto, sob a orientação do Dr.

Rui Medeiros. Com esta revisão foi possível identificar as variantes *WNT4 rs7521902*, *GREB1 rs13394619*, *FNI rs1250248*, *IL1A rs6542095* e *VEZT rs10859871* como possíveis alvos de estudos moleculares devido à alta frequência dos seus respectivos alelos de risco em diferentes populações e a função biológica que cada gene desempenha no desenvolvimento da endometriose (CARDOSO *et al.*, 2020 – no prelo). No entanto, a replicação e a validação dessas variantes em diferentes populações são necessárias para um melhor entendimento da etiopatogenia da doença, a fim de otimizar o diagnóstico e melhorar a eficiência do tratamento clínico da endometriose. A partir dos resultados dessa revisão sistemática, durante o intercâmbio, foram realizadas as genotipagens dos SNPs *WNT4 rs7521902* e *GREB1 rs13394619* pela técnica de PCR em tempo real utilizando sondas *TaqMan* nas amostras recrutadas do presente estudo (casos de endometriose e controles), com o intuito de validar esses SNPs na população brasileira. A análise estatística dos dados encontram-se em andamento para discussão com a colaboração estabelecida com o grupo internacional, e posteriormente serão publicadas em forma de artigo científico em revista indexada de circulação internacional.

Além destas, encontram-se em andamento também a análise dos dados gerados do doutorado sanduíche, referente ao estudo de SNPs envolvidos na via inflamatória (*interleucina-8 – IL-8 rs4073*), hormonal (*Leptina - LEP rs7799039* e *receptor da LEP - LEPR rs1137100*), e da regulação da expressão gênica (*DROSHA rs10719G>A* e *DICER1 rs3742330A>G*) com o desenvolvimento da endometriose. Após o término dessas análises também serão elaborados artigos científicos para publicação em periódicos internacionais.

Os resultados apresentados na presente tese são de suma importância para se compreender as características epidemiológicas e genéticas da endometriose, que é uma doença extremamente complexa e multifatorial, podendo contribuir no aprimoramento das avaliações diagnóstica e prognóstica desta doença, além de possíveis estratégias terapêuticas, proporcionando uma melhor qualidade de vida para as pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, Nelson. Robbins & Cotran-**Patologia**. Elsevier Brasil, 2005.
- ABRÃO, Mauricio Simões. Endometriose: uma visão contemporânea. In: **Endometriose: uma visão contemporânea**. 2000.
- ABRAO, M. S. et al. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 82, n. 1, p. 31-40, 2003.
- ABRÃO, Mauricio Simões et al. Deep endometriosis infiltrating the recto-sigmoid: critical factors to consider before management. **Human reproduction update**, v. 21, n. 3, p. 329-339, 2015.
- ACIÉN, Pedro; VELASCO, Irene. Endometriosis: a disease that remains enigmatic. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2013, 2013.
- AHN, Soo Hyun et al. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- AITKEN, R. John et al. As the world grows: contraception in the 21st century. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1330-1343, 2008.
- AHN, Soo Hyun; SINGH, Vinay; TAYADE, Chandrakant. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 3, p. 523-532, 2017.
- ANDRES, Marina Paula; BORRELLI, Giuliano Moysés; ABRÃO, Mauricio Simões. Endometriosis classification according to pain symptoms: can the ASRM classification be improved?. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 51, p. 111-118, 2018.
- ARIS, Aziz. Endometriosis-associated ovarian cancer: a ten-year cohort study of women living in the Estrie Region of Quebec, Canada. **Journal of ovarian research**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.

AROSH, Joe A. et al. Molecular and preclinical basis to inhibit PGE2 receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 31, p. 9716-9721, 2015.

ARTIGALÁS, Osvaldo et al. Influence of CYP19A1 polymorphisms on the treatment of breast cancer with aromatase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 139, 2015.

ASGHARI, Samira et al. Endometriosis: Perspective, lights, and shadows of etiology. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 163-174, 2018.

ASRM - American Society for Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 1996. **Fertil Steril** 1997.

BABISCHKIN, Jeffery S. et al. Estrogen stimulates the human endometrium to express a factor (s) that promotes vascular smooth muscle cell migration as an early step in microvessel remodeling. **Endocrine**, v. 35, n. 1, p. 81-88, 2009.

BACKONJA, Uba et al. Beyond body mass index: using anthropometric measures and body composition indicators to assess odds of an endometriosis diagnosis. **Journal of Women's Health**, v. 26, n. 9, p. 941-950, 2017.

BALLARD, Karen; LOWTON, Karen; WRIGHT, Jeremy. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 5, p. 1296-1301, 2006.

BARANOV, Vladislav S. et al. Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 185, p. 59-65, 2015.

BARBOSA, C. Parente et al. The effect of hormones on endometriosis development. **Minerva Ginecol**, v. 63, n. 4, p. 375-86, 2011.

BEDAIWY, Mohamed A. et al. Abundance and localization of progesterone receptor isoforms in endometrium in women with and without endometriosis and in peritoneal and ovarian endometriotic implants. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1153-1161, 2015.

BELCHIOR, Gustavo Gross. **Geração de clones de células HEK293 superprodutores de isoformas recombinantes de VEGF-A (Fator de Crescimento Endotelial Vascular A) humano visando à produção de biofármacos para terapia molecular e engenharia tecidual.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2014

BELL, Daphne W. et al. Increased prevalence of EGFR-mutant lung cancer in women and in East Asian populations: analysis of estrogen-related polymorphisms. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4079-4084, 2008.

BELLELIS, Patrick et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis-a case series. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 4, p. 467-71, 2010.

BENAGIANO, Giuseppe; BROSENS, Ivo; LIPPI, Donatella. The history of endometriosis. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2014.

BERNARDI, Lia A. et al. The essential role of GATA6 in the activation of estrogen synthesis in endometriosis. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 1, p. 60-69, 2019.

BIANEK-BODZAK, Agnieszka et al. The importance and perspective of magnetic resonance imaging in the evaluation of endometriosis. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

BORGFELDT, Christer; ANDOLF, Ellika. Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 83, n. 4, p. 395-400, 2004.

BOZDAG, Gurkan et al. CYP17 and CYP2C19 gene polymorphisms in patients with endometriosis. **Reproductive biomedicine online**, v. 20, n. 2, p. 286-290, 2010.

BRAR, Tejinder Kaur; SINGH, K. D.; KUMAR, Avnish. Effect of different phases of menstrual cycle on heart rate variability (HRV). **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 10, p. CC01, 2015.

BRENNER, Robert M.; SLAYDEN, Ov D. Molecular and functional aspects of menstruation in the macaque. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 4, p. 309-318, 2012.

BRICOU, Alexandre; BATT, Ronald E.; CHAPRON, Charles. 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. 127-134, 2008.

BRINCKERHOFF, Constance E.; RUTTER, Joni L.; BENBOW, Ulrike. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4823-4830, 2000.

BRINTON, Louise A. et al. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 12, p. 2929-2935, 2005.

BURNEY, Richard O.; GIUDICE, Linda C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 3, p. 511-519, 2012.

BUTLER, Merlin G.; MCGUIRE, Austen; MANZARDO, Ann M. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, n. 4, p. 495-508, 2015.

CAO, Yihai. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 9, p. 2362-2368, 2007.

CARDOSO, Jessica Vilarinho et al. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 16, n. 3, p. 219-232, 2016a.

CARDOSO, Jéssica Vilarinho et al. Combined effect of vascular endothelial growth factor and its receptor polymorphisms in endometriosis: a case-control study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 209, p. 25-33, 2016b.

CAREY, Adam H. et al. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. **Human molecular genetics**, v. 3, n. 10, p. 1873-1876, 1994.

CHAPRON, Charles et al. Factors and Regional Differences Associated with Endometriosis: A Multi-Country, Case–Control Study. **Advances in therapy**, v. 33, n. 8, p. 1385-1407, 2016.

CHEEWADHANARAKS, Sopon et al. Positive predictive value of clinical diagnosis of endometriosis. **Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet**, v. 87, n. 7, p. 740-744, 2004.

CHEN, Qionghua et al. Change profiles in matrix metalloproteinase-2 and-9 in induced endometriosis in mice. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 30, n. 2, p. 188-192, 2010.

CHEN, Li-Chi et al. Risk of developing major depression and anxiety disorders among women with endometriosis: A longitudinal follow-up study. **Journal of affective disorders**, v. 190, p. 282-285, 2016.

CHENG, Ze-Neng et al. Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism in vitro. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 2, p. 148-154, 2001.

CHOUERI, Toni K.; BUKOWSKI, Ronald M.; RINI, Brian I. The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, 2006. p. 596-606.

CHRISTOFOLINI, Denise Maria et al. CYP2C19 polymorphism increases the risk of endometriosis. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, n. 1, p. 91-94, 2015.

COCCIA, Maria Elisabetta et al. Long-term follow-up after laparoscopic treatment for endometriosis: multivariate analysis of predictive factors for recurrence of endometriotic lesions and pain. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 78-83, 2011.

CONG, Lili; FU, Qiang; GAO, Tianming. CYP17A1 rs743572 polymorphism might contribute to endometriosis susceptibility: evidences from a case-control study. **Medicine**, v. 97, n. 28, 2018.

COUTINHO, Larissa M. et al. New biomarkers in endometriosis. In: **Advances in clinical chemistry**. Elsevier, 2019. p. 59-77.

COX, Kathryn E.; PIVA, Marta; SHARPE-TIMMS, Kathy L. Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1297-1303, 2001.

CRANDALL, David L.; HAUSMAN, Gary J.; KRAL, John G. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. **Microcirculation**, v. 4, n. 2, p. 211-232, 1997.

CRIBB, Alastair E. et al. Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 15, n. 3, p. 551-558, 2006.

DALY, Ann K. Polymorphic variants of cytochrome P450: relevance to cancer and other diseases. In: **Advances in pharmacology**. Academic Press, 2015. p. 85-111.

DE GRAAFF, A. A. et al. The significant effect of endometriosis on physical, mental and social wellbeing: results from an international cross-sectional survey. **Human reproduction**, v. 28, n. 10, p. 2677-2685, 2013.

DELVOUX, Bert et al. Increased production of 17 β -estradiol in endometriosis lesions is the result of impaired metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 3, p. 876-883, 2009.

DE VIVO, Immaculata et al. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 19, p. 12263-12268, 2002.

DENG, Hong-Wen et al. Association of estrogen receptor- α genotypes with body mass index in normal healthy postmenopausal Caucasian women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 8, p. 2748-2751, 2000.

D'HOOOGHE, Thomas M. et al. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved?. In: **Seminars in reproductive medicine**. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2003. p. 243-254.

DI CARLO, Costantino et al. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 6, p. 2315-2323, 2009.

DZUL-CAAMAL, Ricardo et al. The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholinesterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 5, p. 779-790, 2014.

EDWARDS, Todd L. et al. HTR1B, ADIPOR1, PPARGC1A, and CYP19A1 and obesity in a cohort of Caucasians and African Americans: an evaluation of gene-environment interactions and candidate genes. **American journal of epidemiology**, v. 175, n. 1, p. 11-21, 2011.

EMMERSON, Stuart J.; GARGETT, Caroline E. Endometrial mesenchymal stem cells as a cell based therapy for pelvic organ prolapse. **World journal of stem cells**, v. 8, n. 5, p. 202, 2016.

ERMAN, H. et al. The association of vascular endothelial growth factor, metalloproteinases and their tissue inhibitors with cardiovascular risk factors in the metabolic syndrome. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 6, p. 1015-1022, 2016.

ESKENAZI, Brenda; WARNER, Marcella L. Epidemiology of endometriosis. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 235-258, 1997.

FACCHIN, Federica et al. Impact of endometriosis on quality of life and mental health: pelvic pain makes the difference. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 36, n. 4, p. 135-141, 2015.

FAUCONNIER, Arnaud et al. Comparison of patient-and physician-based descriptions of symptoms of endometriosis: a qualitative study. **Human reproduction**, v. 28, n. 10, p. 2686-2694, 2013.

FEITELSON, Mark A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S25-S54.

FERRERO, Simone et al. Treatment of pain associated with deep endometriosis: alternatives and evidence. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 4, p. 771-792, 2015.

FERRERO, Simone et al. Aromatase and endometriosis: estrogens play a role. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1317, n. 1, p. 17-23, 2014.

FIGG, William D.; FOLKMAN, Judah (Ed.). **Angiogenesis: an integrative approach from science to medicine**. Springer Science & Business Media, 2008.

FULDEORE, Mahesh et al. Healthcare utilization and costs in women diagnosed with endometriosis before and after diagnosis: a longitudinal analysis of claims databases. **Fertility and sterility**, v. 103, n. 1, p. 163-171, 2015.

FULDEORE, Mahesh J.; SOLIMAN, Ahmed M. Prevalence and symptomatic burden of diagnosed endometriosis in the United States: national estimates from a cross-sectional survey of 59,411 women. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 82, n. 5, p. 453-461, 2017.

GOETZ, Laura G.; MAMILLAPALLI, Ramanaiah; TAYLOR, Hugh S. Low body mass index in endometriosis is promoted by hepatic metabolic gene dysregulation in mice. **Biology of reproduction**, v. 95, n.6, p. 115, 1-8, 2016.

GHIASI, Marzieh; KULKARNI, Madhavi Thombre; MISSMER, Stacey A. Is endometriosis more common and more severe than it was 30 years ago?. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, 2019.

GHISARI, Mandana et al. Polymorphisms in Phase I and Phase II genes and breast cancer risk and relations to persistent organic pollutant exposure: a case-control study in Inuit women. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 19, 2014.

GIANGRANDE, Paloma H. et al. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 9, p. 3102-3115, 2000.

GILABERT-ESTELLES, J. et al. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. **Human Reproduction**, v. 18, n. 7, p. 1516-1522, 2003.

GILABERT-ESTELLÉS, J. et al. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. **Human Reproduction**, v. 22, n. 8, p. 2120-2127, 2007.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis and Infertility. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 789-799, 2004.

GIUDICE, L. C.; SWIERSZ, L. M.; BURNEY, R. O. Endometriosis. In: Jameson JL, De Groot LJ (eds). **Endocrinology**. 2010.

GUERRIERO, Stefano et al. Role of imaging in the management of endometriosis. **Minerva ginecologica**, v. 65, n. 2, p. 143-166, 2013.

HAIMAN, Christopher A. et al. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. **Cancer Research**, v. 59, n. 5, p. 1015-1020, 1999.

HEILIER, Jean-François et al. Environmental and host-associated risk factors in endometriosis and deep endometriotic nodules: a matched case-control study. **Environmental research**, v. 103, n. 1, p. 121-129, 2007.

HOTTAT, Nathalie et al. Endometriosis: contribution of 3.0-T pelvic MR imaging in preoperative assessment—initial results. **Radiology**, v. 253, n. 1, p. 126-134, 2009.

HOYOS, Luis R.; JOHNSON, Samuel; PUSCHECK, Elizabeth. Endometriosis and imaging. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 60, n. 3, p. 503-516, 2017.

HSIEH, Yao-Yuan et al. Cytochrome P450c17 α 5'-untranslated region* T/C polymorphism in endometriosis. **Journal of genetics**, v. 83, n. 2, p. 189-192, 2004.

HSIEH, Yao-Yuan et al. Estrogen receptor α dinucleotide repeat and cytochrome P450c17 α gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 3, p. 567-572, 2005.

HUDELIST, Gernot et al. Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. **Human reproduction**, v. 27, n. 12, p. 3412-3416, 2012.

HUGHES, C. L.; FOSTER, W. G.; AGARWAL, S. K. The impact of endometriosis across the lifespan of women: foreseeable research and therapeutic prospects. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

HUR, Sung Eun et al. Polymorphisms and haplotypes of the gene encoding the estrogen-metabolizing CYP19 gene in Korean women: no association with advanced-stage endometriosis. **Journal of human genetics**, v. 52, n. 9, p. 703, 2007.

IKUHASHI, Yoshiyuki et al. Vascular endothelial growth factor+ 936 C/T polymorphism is associated with an increased risk of endometriosis in a Japanese population. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 86, n. 11, p. 1352-1358, 2007.

INCEBOZ, Umit. Endometriosis after menopause. **Women's Health**, v. 11, n. 5, p. 711-715, 2015.

IZAWA, Masao; TANIGUCHI, Fuminori; HARADA, Tasuku. Molecular background of estrogen receptor gene expression in endometriotic cells. *Reproductive Sciences*, v. 23, n. 7, p. 871-876, 2016.

JEUNG, InCheul; CHEON, Keunyoung; KIM, Mee-Ran. Decreased cytotoxicity of peripheral and peritoneal natural killer cell in endometriosis. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

JIAO, Luyang et al. Effect of traditional Chinese medicine (Xiaochaihu Tang) on the expression of MMP-2 and MMP-9 in rats with endometriosis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 6, n. 6, p. 1385-1389, 2013.

JUO, S. H. et al. CYP17, CYP1A1 and COMT polymorphisms and the risk of adenomyosis and endometriosis in Taiwanese women. **Human Reproduction**, v. 21, n. 6, p. 1498-1502, 2006.

KADO, Noriko et al. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 897-902, 2002.

KHAN, Khaleque Newaz et al. Immunopathogenesis of pelvic endometriosis: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 5, p. 383-404, 2008.

KHO, Rosanne M.; ABRAO, Mauricio S. Ovarian remnant syndrome: etiology, diagnosis, treatment and impact of endometriosis. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 24, n. 4, p. 210-214, 2012.

KLAGSBRUN, Michael. Regulators of angiogenesis: stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. **Journal of cellular biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 199-200, 1991.

KOBAYASHI, H. et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 17, n. 1, p. 37-43, 2007.

KOKS, Carolien AM et al. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. **Fertility and sterility**, v. 68, n. 3, p. 560-564, 1997.

KOLTERMANN, Katharina C. et al. Economic burden of deep infiltrating endometriosis of the bowel and the bladder in Germany: The statutory health insurance perspective. **Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen**, v. 118, p. 24-30, 2016.

LAFAY PILLET, Marie-Christine et al. Deep infiltrating endometriosis is associated with markedly lower body mass index: a 476 case–control study. **Human Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 265-272, 2011.

LAGANÀ, Antonio Simone et al. Analysis of psychopathological comorbidity behind the common symptoms and signs of endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 194, p. 30-33, 2015.

LAMP, Merit et al. Polymorphisms in ESR1, ESR2 and HSD17B1 genes are associated with fertility status in endometriosis. **Gynecological Endocrinology**, v. 27, n. 6, p. 425-433, 2011.

LAVADO, Ramon et al. Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: Contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. **Toxicology letters**, v. 226, n. 2, p. 192-197, 2014.

LETRA, Ariadne et al. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 94, n. 7, p. 540-548, 2012.

LEYLAND, Nicholas et al. Endometriosis: diagnosis and management. **Journal of Endometriosis**, v. 2, n. 3, p. 107-134, 2010.

LIANG, Yu-Xiang et al. The high concentration of progesterone is harmful for endometrial receptivity and decidualization. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 712, 2018.

LIU, Qing et al. Association of polymorphisms– 1154G/A and– 2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. **Human reproduction**, v. 24, n. 10, p. 2660-2666, 2009.

LOEBIG, Michaela et al. Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. **PloS one**, v. 5, n. 9, p. e12610, 2010.

LOHELA, Marja et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 2, p. 154-165, 2009.

LOUIS, Germaine M. Buck et al. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 2, p. 360-365, 2011.

LU, Yi et al. Shared genetics underlying epidemiological association between endometriosis and ovarian cancer. **Human molecular genetics**, v. 24, n. 20, p. 5955-5964, 2015.

LU, Ying-Yuan et al. Identification of cytochrome P450s involved in the metabolism of 6-benzyl-1-benzylloxymethyl-5-iodouracil (W-1) using human recombinant enzymes and rat liver microsomes in vitro. **Xenobiotica**, v. 47, n. 8, p. 667-672, 2017.

LV, Xuan; CHEN, Pei; LIU, Wei. Down regulation of MiR-93 contributes to endometriosis through targeting MMP3 and VEGFA. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 5, p. 1706, 2015.

MABROUK, Mohamed et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 285, n. 5, p. 1307-1312, 2012.

MACCAGNANO, Carmen et al. Diagnosis and treatment of bladder endometriosis: state of the art. **Urologia internationalis**, v. 89, n. 3, p. 249-258, 2012.

MACHADO, Daniel Escorsim et al. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 1, p. 148-155, 2008.

MACHADO, Daniel Escorsim et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 8, p. 2674-2679, 2010.

MABROUK, Mohamed et al. Performance of peripheral (serum and molecular) blood markers for diagnosis of endometriosis. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 285, n. 5, p. 1307-1312, 2012.

MARQUES, Marcos Roberto et al. **Endometriose e infertilidade: revisão sistemática da literatura e relato de casos**. 2004. 111 f. Trabalho de Graduação do Curso Superior de Medicina, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

MARQUI, Alessandra Bernadete Trovó de. Evaluation of endometriosis-associated pain and influence of conventional treatment: a systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 6, p. 507-518, 2015.

MAUVAIS-JARVIS, Franck; CLEGG, Deborah J.; HEVENER, Andrea L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 3, p. 309-338, 2013.

MEOLA, Juliana et al. Differentially expressed genes in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 6, p. 1750-1773, 2010.

MODUGNO, Francesmary et al. Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 191, n. 3, p. 733-740, 2004.

MORADI, Maryam et al. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. **BMC women's health**, v. 14, n. 1, p. 123, 2014.

MOUSAZADEH, Sepideh et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms related to PGR+331g/a polymorphism in endometriosis: A case-control study. **International Journal of Reproductive Biomedicine**, v. 17, n. 3, 2019.

NÁCUL, Andrea Prestes; SPRITZER, Poli Mara. Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 6, p. 298-307, 2010.

NAGASE, Hideaki et al. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. **Biochemistry**, v. 29, n. 24, p. 5783-5789, 1990.

NEZHAT, Farr et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 5, p. 1559-1570, 2008.

NILSSON, M. et al. Oestrogen receptor α gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. **International journal of obesity**, v. 31, n. 6, p. 900, 2007.

NISHIMURA, Satoshi et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1517-1526, 2007.

NISOLLE, Michelle; DONNEZ, Jacques. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertility and sterility**, v. 68, n. 4, p. 585-596, 1997.

NNOAHAM, Kelechi E. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 2, p. 366-373. e8, 2011.

NNOAHAM, Kelechi E. et al. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 3, p. 702-712. e6, 2012.

NOGUCHI, Yutaka et al. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 12, p. 6063-6072, 2003.

OKURA, T. et al. Association of polymorphisms in the estrogen receptor α gene with body fat distribution. **International journal of obesity**, v. 27, n. 9, p. 1020, 2003.

OZKAN, Sebiha; MURK, William; ARICI, Aydin. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, n. 1, p. 92-100, 2008.

PAINTER, Jodie N. et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15. 2 associated with endometriosis. **Nature genetics**, v. 43, n. 1, p. 51, 2011.

PAINTER, Jodie N. et al. Common variants in the CYP2C19 gene are associated with susceptibility to endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 496-502. e5, 2014.

PARAZZINI, F. et al. Selected food intake and risk of endometriosis. **Human Reproduction**, v. 19, n. 8, p. 1755-1759, 2004.

PATEL, Bansari et al. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. **Human reproduction update**, v. 21, n. 2, p. 155-173, 2014.

PATEL, Bansari G. et al. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 96, n. 6, p. 623-632, 2017.

PAVONE, Mary Ellen; LYTTLE, Brianna M. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. **International journal of women's health**, v. 7, p. 663, 2015.

PEARCE, C. L. et al. Progesterone receptor variation and risk of ovarian cancer is limited to the invasive endometrioid subtype: results from the Ovarian Cancer Association Consortium pooled analysis. **British journal of cancer**, v. 98, n. 2, p. 282-288, 2008.

PEARCE, Celeste Leigh et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case–control studies. **The lancet oncology**, v. 13, n. 4, p. 385-394, 2012.

PERINI, Jamila Alessandra et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C> A,-460 T> C,-1154G> A,+ 405G> C and+ 936C> T) in endometriosis: a case–control study with Brazilians. **BMC women's health**, v. 14, n. 1, p. 117, 2014.

RAGHU, K. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. **Nat Med**, v. 3, p. 442-433, 2003.

RAHMIOGLU, Nilufer et al. Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. **Human reproduction update**, v. 20, n. 5, p. 702-716, 2014.

RAHMIOGLU, Montgomery. Zondervan. Genetics of endometriosis. **Womens Health**, v. 11, n. 5, p. 577-86, 2015.

RALEIGH, Stuart M. et al. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. **British journal of sports medicine**, v. 43, n. 7, p. 514-520, 2009.

ROBBOY, Stanley J.; BEAN, Sarah M. Pathogenesis of endometriosis. **Reproductive biomedicine online**, v. 21, n. 1, p. 4-5, 2010.

RODGERS, William H. et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. **The Journal of clinical investigation**, v. 94, n. 3, p. 946-953, 1994.

RUAN, Y. Q.; LIANG, W. G.; HUANG, S. H. Analysis of laparoscopy on endometriosis patients with high expression of CA125. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 8, p. 1334-7, 2015.

RUSH, Georgia; MISAJON, RoseAnne. Examining subjective wellbeing and health-related quality of life in women with endometriosis. *Health care for women international*, v. 39, n. 3, p. 303-321, 2018.

SACCARDI, C. et al. Comparison between transvaginal sonography, saline contrast sonovaginography and magnetic resonance imaging in the diagnosis of posterior deep infiltrating endometriosis. ***Ultrasound in Obstetrics & Gynecology***, v. 40, n. 4, p. 464-469, 2012.

SAHA, Rama et al. Heritability of endometriosis. ***Fertility and sterility***, v. 104, n. 4, p. 947-952, 2015.

SAHA, Rama et al. Reproductive and lifestyle factors associated with endometriosis in a large cross-sectional population sample. ***Journal of Women's Health***, v. 26, n. 2, p. 152-158, 2017.

SAMAVAT, Hamed; KURZER, Mindy S. Estrogen metabolism and breast cancer. ***Cancer letters***, v. 356, n. 2, p. 231-243, 2015.

SANTOS, Paulo CJL et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. ***BMC medical genetics***, v. 12, n. 1, p. 13, 2011.

SELÇUK, İlker; BOZDAĞ, Gürkan. Recurrence of endometriosis; risk factors, mechanisms and biomarkers; review of the literature. ***Journal of the Turkish German Gynecological Association***, v. 14, n. 2, p. 98, 2013.

SHAFRIR, Amy L. et al. Risk for and consequences of endometriosis: a critical epidemiologic review. ***Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology***, v. 51, p. 1-15, 2018.

SHAH, Divya K. et al. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. ***Human Reproduction***, v. 28, n. 7, p. 1783-1792, 2013.

SHAHBAZI, Shirin; SHAHRABI-FARAHANI, Maryam. Evaluation of the correlation between body mass index and endometriosis among Iranian fertile women. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 2, p. 157-160, 2016.

SILHA, J. V. et al. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. **International journal of obesity**, v. 29, n. 11, p. 1308, 2005.

SILLEM, Martin et al. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, n. 2, p. 167-174, 2001.

SILVA, Rita de Cássia Pereira da et al. Estrogen signaling in the proliferative endometrium: implications in endometriosis. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 1, p. 72-77, 2016.

SIMPSON, E. R. Role of aromatase in sex steroid action. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 149-156, 2000.

SINAI, Ninet et al. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. **Fertility and sterility**, v. 89, n. 3, p. 538-545, 2008.

SNOEK-VAN BEURDEN, Patricia AM; VON DEN HOFF, Johannes W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.

STAAL, A. H. J.; VAN DER ZANDEN, M.; NAP, A. W. Diagnostic delay of endometriosis in the Netherlands. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 81, n. 4, p. 321-324, 2016.

SUGIMOTO, Mitsushige; FURUTA, Takahisa. Efficacy of tailored Helicobacter pylori eradication therapy based on antibiotic susceptibility and CYP2C19 genotype. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 21, p. 6400, 2014.

SUNDQVIST, J. et al. Replication of endometriosis-associated single-nucleotide polymorphisms from genome-wide association studies in a Caucasian population. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 835-839, 2013.

SUSHEELAMMA, Chithra Janardhanan; PILLAI, Sathy M.; NAIR, Sivakumari Asha. Oestrogen, progesterone and stem cells: the discordant trio in endometriosis?. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 20, 2018.

TABIBZADEH, Siamak. Immunoreactivity of human endometrium: correlation with endometrial dating. **Fertility and sterility**, v. 54, n. 4, p. 624-631, 1990.

TABIBZADEH, Siamak. Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals. **Front Biosci**, v. 7, p. d1475-d1486, 2002.

TAFI, Emanuela et al. Advances in pharmacotherapy for treating endometriosis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 16, p. 2465-2483, 2015.

TAHERGORABI, Zoya; KHAZAEI, Majid. A review on angiogenesis and its assays. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 15, n. 6, p. 1110, 2012.

TANDOI, Iacopo et al. High rate of endometriosis recurrence in young women. **Journal of pediatric and adolescent gynecology**, v. 24, n. 6, p. 376-379, 2011.

The ESHRE **Guideline for the Diagnosis and Treatment of Endometriosis**. <http://guidelines.endometriosis.org/> 2008.

TRABERT, Britton 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. e3, 2011.

UMEZAWA, Masakazu et al. Expression profile of extracellular matrix and adhesion molecules in the development of endometriosis in a mouse model. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1365-1372, 2012.

VAN DEN BERG, Liseth L. et al. Analysis of biomarker expression in severe endometriosis and determination of possibilities for targeted intraoperative imaging. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 121, n. 1, p. 35-40, 2013.

VAN KAAM, K. J. A. F. et al. Progesterone receptor polymorphism+ 331G/A is associated with a decreased risk of deep infiltrating endometriosis. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2006.

VAN THEMSCHE, Céline; POTWOROWSKI, Édouard F.; ST-PIERRE, Yves. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 315, n. 4, p. 884-891, 2004.

VERCELLINI, Paolo et al. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. **Human reproduction**, v. 22, n. 1, p. 266-271, 2006.

VERCELLINI, Paolo et al. Repetitive surgery for recurrent symptomatic endometriosis: what to do?. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 146, n. 1, p. 15-21, 2009.

VERCELLINI, P. et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature reviews Endocrinology**. 2014; 10 (5): 261–75, 2013.

VERIT, Fatma Ferda; YUCEL, Oguz. Endometriosis, leiomyoma and adenomyosis: the risk of gynecologic malignancy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 5589-5597, 2013.

VIETRI, Maria Teresa et al. CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in women affected with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 5, p. 1532-1535, 2009.

VIGANÒ, Paola et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 177-200, 2004.

VITONIS, Allison F. et al. Adult physical activity and endometriosis risk. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 21, n. 1, p. 16, 2010.

WANG, Zhuo et al. Polymorphisms in the estrogen receptor β gene but not estrogen receptor α gene affect the risk of developing endometriosis in a Japanese population. **Fertility and sterility**, v. 81, n. 6, p. 1650-1656, 2004.

WANG, Wenwen et al. Association of an oestrogen receptor gene polymorphism in Chinese Han women with endometriosis and endometriosis-related infertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 26, n. 1, p. 93-98, 2013.

WANG, Kuan-Chin et al. An increased risk of epithelial ovarian cancer in Taiwanese women with a new surgico-pathological diagnosis of endometriosis. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 831, 2014.

WIELSØE, Maria et al. Genetic Variations, Exposure to Persistent Organic Pollutants and Breast Cancer Risk—A Greenlandic Case–Control Study. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 123, n. 3, p. 335-346, 2018.

WILBUR, Mary Ann et al. Cancer implications for patients with endometriosis. In: Seminars in reproductive medicine. **Thieme Medical Publishers**, 2017. p. 110-116.

WÖLFLER, Monika Martina et al. Altered expression of progesterone receptor isoforms A and B in human eutopic endometrium in endometriosis patients. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 206, p. 1-6, 2016.

YAMADA, Yoshiji et al. Association of polymorphisms of the estrogen receptor α gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 7, p. 452-460, 2002.

YAN, Fei et al. Interaction between smoking and CYP2C19* 3 polymorphism increased risk of lung cancer in a Chinese population. **Tumor Biology**, v. 35, n. 6, p. 5295-5298, 2014.

YANG, Xin; CHEN, S. Q.; LIU, Meng. Association of the CYP19 gene polymorphism with genetic susceptibility to endometriosis. **Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics**, v. 27, n. 6, p. 692-696, 2010.

YU, Hann-Chin et al. Increased association between endometriosis and endometrial cancer: a nationwide population-based retrospective cohort study. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 25, n. 3, p. 447-452, 2015.

YU, X. et al. Expression and significance of ER β and TrkB in endometriosis. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 43, n. 1, p. 75-81, 2016.

ZONDERVAN, K.T.; BECKER, C.M.; MISSMER, S.A. Endometriosis. **N Engl J Med**. 2020 Mar 26;382(13):1244-1256.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/HFSE**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

Secretaria de Assistência à Saúde

Departamento de Desenvolvimento, Avaliação e Controle de Serviços de Saúde

Escritório de Representação do Ministério da Saúde no Estado do Rio de Janeiro

Coordenação Geral das Unidades Hospitalares Próprias

HOSPITAL FEDERAL DOS SERVIDORES DO ESTADO

=====

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose****Pesquisador Responsável:** Dr. Plinio Tostes Berardo

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado - RJ.

Introdução:

Esta pesquisa visa estudar melhor uma doença chamada endometriose que significa a presença de um tumor benigno feito de tecido endometrial (o mesmo que existe dentro do útero) que pode causar dor e dificuldade para engravidar, e desta maneira muitas vezes deve ser retirado através de cirurgia. O objetivo desta pesquisa é tentar entender por que algumas mulheres desenvolvem endometriose e outras não. Para isso, nós iremos estudar o perfil genético de mulheres com endometriose.

Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Durante o acompanhamento clínico no HFSE, após o diagnóstico da endometriose, você deverá ter visitas ambulatoriais trimestrais, depois de um ano sem sintomas as visitas serão semestrais por mais um ano quando deverá estar apta para alta do HFSE para acompanhamento de rotina ginecológica em unidade primária ou secundária de saúde com encaminhamento detalhado feito em guia de contra referência segundo as normas de

funcionamento do Serviço de Ginecologia do HFSE. No caso de falha do tratamento inicial ou retorno dos sintomas a frequência de visitas e procedimentos adicionais será individualizada de acordo com o seu caso, sendo assegurada todas as medidas necessárias para o tratamento de sua doença.

Se você concordar em participar deste estudo, uma pequena e única quantidade de sangue (3ml) será coletada para se obter o seu DNA (material genético de características únicas de cada pessoa) e identificar as características dos genes relacionados com o desenvolvimento da endometriose. Desta maneira, os objetivos deste projeto incluem: (a) Determinar se existem alterações genéticas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da endometriose em mulheres diagnosticadas com a doença, tendo o benefício de saber se você ou sua família tem maior risco de desenvolver a doença e com isso poder definir condutas de prevenção e diagnóstico precoce; (b) Avaliar se estas alterações têm relações com a idade, tipo dos sintomas ou agressividade da doença.

Descrição dos procedimentos:

A sua participação no estudo é VOLUNTÁRIA, e caso você concorde em participar do estudo você deverá passar pelas seguintes etapas: (a) entrevista com um profissional da saúde da equipe de pesquisa que lhe explicará as etapas e procedimentos do estudo e poderá esclarecer as suas dúvidas em relação a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Questionário Clínico-Demográfico; (b) assinatura deste Termo de Consentimento; (c) preenchimento do Questionário Clínico-Demográfico, que visa a obtenção de informações clínicas e demográficas das pacientes envolvidas no estudo (Anexo II), tais informações destinam-se a assegurar a abrangência e restringir eventuais tendências da amostra populacional; (d) coleta de uma única amostra de sangue que será utilizada para a análise de alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da endometriose as quais serão realizadas no Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO).

Segurança do voluntário e Benefícios do estudo:

O Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro. A sua participação no estudo é voluntária e mesmo que concorde em participar, você tem o direito de desistir e interromper a sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão e neste caso você não terá nenhum prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento na Instituição. No caso de desistência o seu material biológico (sangue) armazenado assim como os seus dados pessoais será prontamente descartado de

forma definitiva. Este estudo não trará nenhum benefício imediato para você assim como não receberá qualquer tipo de recompensa pela sua participação.

Confidencialidade:

É garantida a confidencialidade das informações obtidas, não sendo divulgados seus dados pessoais em momento algum. Seus dados pessoais somente serão conhecidos pelos médicos e demais profissionais que participam deste estudo. Os resultados de suas análises serão do seu conhecimento caso manifeste esta vontade. Qualquer publicação que seja feita com os resultados desta pesquisa não incluirá nome ou outros identificadores dos participantes da pesquisa. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisas relacionadas à endometriose, assim o material que não for utilizado ficará estocado para estudos futuros por um período de cinco anos Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) o qual tem todas as condições adequadas para estocagem de material biológico. Caso manifeste desejo de desistência em participar do estudo, em qualquer momento poderá retirar seu consentimento para armazenamento de amostra biológica (sangue) bem como de seus dados pessoais.

Despesas e compensações:

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Você não está abrindo mão de qualquer direito legal ao participar deste estudo.

Com quem devo entrar em contato em caso de dúvidas?

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o Dr. Plinio Tostes Berardo que pode ser encontrado no Serviço de Ginecologia no 7º andar do prédio principal do HFSE ou pelos telefones: (021) 2335-7535 ramal: 171 ou 98825-0115. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HFSE, situado no 5º andar do prédio dos ambulatórios do mesmo hospital, que é o órgão responsável em avaliar a parte ética das pesquisas com seres humanos além de assegurar o bem estar e os direitos dos sujeitos da pesquisa durante o desenvolvimento da mesma.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 201_.

Dr. Plinio Tostes Berardo - Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____
CPF _____, Prontuário nº _____,
Matrícula nº _____, abaixo assinado, concordo em participar
do estudo Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do
desenvolvimento da endometriose, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido
pelo pesquisador Plinio Tostes Berardo sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos.
Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve
a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Rio de Janeiro ____ de _____ de 201_.

Nome e Assinatura do sujeito:

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

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/HMF

Hospital Moncorvo Filho Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose

Pesquisador Responsável: Dr. Renato Ferrari, Dr. Plínio Tostes Berardo e Dr. Jamila Alessandra Perini Machado.

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Moncorvo Filho.

Introdução:

Esta pesquisa visa estudar melhor uma doença chamada endometriose que significa a presença de um tumor benigno feito de tecido endometrial (o mesmo que existe dentro do útero) que pode causar dor e dificuldade para engravidar, e desta maneira muitas vezes deve ser retirado através de cirurgia. O objetivo desta pesquisa é tentar entender por que algumas mulheres desenvolvem endometriose e outras não. Para isso, nós iremos estudar o perfil genético de mulheres com e sem endometriose.

Desenho do estudo e objetivo(s):

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Se você concordar em participar deste estudo, uma pequena e única quantidade de sangue (3ml) será coletada durante a consulta de rotina no Serviço de Ginecologia para se obter o seu DNA (material genético de características únicas de cada pessoa) e identificar as características dos genes relacionados com o desenvolvimento da endometriose. Dessa maneira, os objetivos deste projeto incluem: (a) Determinar se existem alterações genéticas

que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da endometriose em benefício de saber se você ou sua família tem maior risco de desenvolver endometriose e com isso poder definir condutas de prevenção e diagnóstico precoce; (b) Avaliar se estas alterações têm relações com a idade, tipo dos sintomas ou agressividade da doença.

Descrição dos procedimentos:

A sua participação no estudo é VOLUNTÁRIA, e caso você concorde em participar do estudo você deverá passar pelas seguintes etapas: (a) entrevista com um profissional da saúde da equipe de pesquisa que lhe explicará as etapas e procedimentos do estudo e poderá esclarecer as suas dúvidas em relação a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e ao Questionário Clínico-Demográfico; (b) assinatura deste Termo de Consentimento; (c) preenchimento do Questionário Clínico-Demográfico, que visa a obtenção de informações clínicas e demográficas das pacientes envolvidas no estudo (Anexo), tais informações destinam-se a assegurar a abrangência e restringir eventuais tendências da amostra populacional; (d) coleta de uma única amostra de sangue que será utilizada para a análise de alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento da endometriose as quais serão realizadas no Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas (LaPesF) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO).

Segurança do voluntário e Benefícios do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Moncorvo Filho aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro. A sua participação no estudo é voluntária e mesmo que concorde em participar, você tem o direito de desistir e interromper a sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar esta decisão e neste caso você não terá nenhum prejuízo quanto à continuidade de seu tratamento na Instituição. No caso de desistência o seu material biológico (sangue) armazenado assim como os seus dados pessoais será prontamente descartado de forma definitiva. Este estudo não trará nenhum benefício imediato para você assim como não receberá qualquer tipo de recompensa pela sua participação.

Confidencialidade:

É garantida a confidencialidade das informações obtidas, não sendo divulgados seus dados pessoais em momento algum. Seus dados pessoais somente serão conhecidos pelos médicos e demais profissionais que participam deste estudo. Os resultados de suas análises serão do seu conhecimento caso manifeste esta vontade. Qualquer publicação que seja feita com os resultados desta pesquisa não incluirá nome ou outros identificadores dos participantes da pesquisa. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material

coletado somente para pesquisas relacionadas à endometriose, assim o material que não for utilizado ficará estocado para estudos futuros por um período de cinco anos no Laboratório LaPesF da UEZO o qual tem todas as condições adequadas para estocagem de material biológico. Caso manifeste desejo de desistência em participar do estudo, em qualquer momento poderá retirar seu consentimento para armazenamento de amostra biológica (sangue) bem como de seus dados pessoais.

Despesas e compensações:

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo. Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Você não está abrindo mão de qualquer direito legal ao participar deste estudo.

Com quem devo entrar em contato em caso de dúvidas?

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Você pode entrar em contato com um dos pesquisadores deste estudo, Jamila Perini, pelos telefones: (021) 2335-7535 ramal: 171 ou 98825-0115. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Moncorvo Filho, que é o órgão responsável em avaliar a parte ética das pesquisas com seres humanos além de assegurar o bem estar e os direitos dos sujeitos da pesquisa durante o desenvolvimento da mesma.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 201 ____.

Dr. Renato Ferrari - Pesquisador responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG _____ CPF _____, Prontuário nº _____,
_____, Matrícula nº _____,
abaixo assinado, concordo em participar do estudo Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Dr. Renato Ferrari sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Rio de Janeiro ____ de _____ de 201__.

Nome e Assinatura da voluntária:

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

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO C – QUESTIONÁRIO SOCIO-DEMOGRÁFICO E CLÍNICO

Pesquisa: “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose”

Amostra de Sangue	
Nº da Caixa:	_ _
Freezer:	_____
Quantidade Total de Sangue:	_ _ ml
Quantidade de Tubos:	_ _

ID da voluntária: _____
Hospital de captação: (1) HFSE (2) HFL
Data da entrevista: _ _ - _ _ - _ _ _ _
Entrevistador: _____

ENTREVISTA INICIAL

A - Critérios de Elegibilidade

A1 - Nome da voluntária:

A2 - Data nascimento: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| **A3 - Local de nascimento (estado):** |_|_|

A4 - Sujeito potencial para:

(1) Endometriose () Controle. Se “Controle”, qual tipo?

(2) Ginecológico – Tipo de cirurgia e/ou doença ginecológica

(3) Laqueadura (4) Acompanhante – Não cirúrgico (5) Excluídas.

Motivo: _____

A5 - Endereço Atual: _____ **Nº:**

A6 - Bairro: _____

A7 - Cidade: _____ **A8 - Estado:** |_|_|

A9 - CEP: |_|_|_|_|_|-|_|_|_| **A10 - Telefones de contato:** (|_|_|)|_|_|_|_|_|-|_|_|_|_|_|

A11 - E-mail: _____

B - Identificação (dados do prontuário)

B1 - Prontuário: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

B2 - Tipo de cirurgia realizada: (1) Laparoscopia (2) Laparotomia

B3 - Data do Laudo Histopatológico: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

B4 - Estadiamento Endometriose: (1) I (2) II (3) III (4) IV

B5 - Infiltrativa/Profunda: (0) Não (1) Sim

B6 - Local/Órgão da Endometriose:

(1) Ovários (2) Peritônio (3) Bexiga (4) Ureter

(5) Retosigmoide/Retrocervical (6) Intestino (7) Septo Reto-vaginal (8) Útero Sacro

(9) Apêndice (10) Óleo (11) Outros. Especifique: _____

B7 - Fez dosagem do CA125?

(0) Não (1) Sim, 1 vez. Valor: _____ Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

(2) Sim, 2 vezes. Valor: _____ Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| Valor: _____ Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

C - Características da voluntária

C1 - Peso: _____ kg **C2 - Altura:** _____ m

C3 - Estado civil: (1) Estável – casada ou companheira (2) Divorciada / separada (3) Viúva (4) Solteira
(9) sem informação

C4 - Nível de Instrução (Anos de estudos completos): (0) Analfabeto

(1) Ensino Fundamental (1º Grau) INCOMPLETO

(2) Ensino Fundamental (1º Grau) COMPLETO

(3) Ensino Médio (2º Grau) INCOMPLETO

(4) Ensino Médio (2º Grau) COMPLETO

(5) Ensino Superior INCOMPLETO

(6) Ensino Superior COMPLETO

(7) Mestrado

(8) Doutorado

C5 - Em sua opinião, qual é a sua cor de pele ou etnia?

(1) Branca (2) Amarela (3) Parda (4) Indígena (5) Negra (6) Outros – especificar:

C6 - Cor da Pele segundo o Entrevistador:

(1) Branca (2) Amarela (3) Parda (4) Indígena (5) Negra (6) Outros – especificar:

D - História Clínica Pacientes com Endometriose (características iniciais da doença)

D1 - Já realizou procedimentos cirúrgicos para remoção dos focos de endometriose? (0) Não (1) Sim

(SE “NÃO”, VÁ PARA D5)

D2 - Se sim, qual foi o número de vezes que realizou procedimentos cirúrgicos para remoção dos focos de endometriose? |_|_|

D3 - Fez algum tipo de tratamento antes do procedimento cirúrgico para remoção dos focos de endometriose? (0) Não (1) Sim

D4 - Se sim, Qual o tratamento?

D5 - Com que idade você foi diagnosticada com Endometriose? |_|_| (anos)

E - História Clínica Geral (características iniciais da doença)

E1 - Você já passou por alguma cirurgia no abdômen? (0) Não (1) Sim **Se sim, quantas?** _____ // E quais? _____

E2 - E outra cirurgia, já realizou? (0) Não (1) Sim. **Se sim especificar**

E3 - Qual foi o Motivo da sua procura pelo médico?

Motivo	Sim ou Não?	Observação
Dor? Se sim especificar onde.	(0) Não (1) Sim	
Incapacidade de Gestar?	(0) Não (1) Sim	
Outra? Especificar qual.	(0) Não (1) Sim	

E4 - Com que idade foi sua primeira ida ao médico, pelo motivo acima citado, antes dessa cirurgia para o diagnóstico ou tratamento? |_|_| (anos)

E5 - Idade da menarca: ____ (anos)

E6 - Já entrou na menopausa? (0) Não (1) Sim

E7 - Se sim, com que idade? _____ (anos)

E8 - Você considera seu fluxo: (1) Diminuído (2) Normal (3) Aumentado

E9 - Ciclo menstrual: (1) Regular (2) Irregular

E10 - Quantos dias duram a sua menstruação? _____ (dias)

E11 - Quantos dias duram em média os intervalos entre as menstruações? _____ (dias)

E12 - Em relação a sua fertilidade, você: (SE “(3)”, VÁ PARA E18)(SE “(1)”, VÁ PARA

E14) (1) Nunca conseguiu engravidar (Primária) **Quanto tempo está tentando engravidar?** _____ (meses)

(2) Possui filhos, mas atualmente não consegue engravidar (Secundária) **Quanto tempo está tentando engravidar?** _____ (meses)

(3) Não possui filhos, e não tenta engravidar (não tem vida sexual ativa, usa método anticoncepcional, etc.)

(4) Já possui filhos, e não deseja mais engravidar

E13 - Em relação as suas gestações, Quantas foram?

Paridade: (0) Não (1) Um filho (2) Dois filhos (3) Três filhos (4) Quatro filhos (5) Cinco filhos (6) Seis ou mais filhos

Partos Normais: _____

Partos Cesárea: _____

Gravidez Ectópica: _____

Idade da primeira gestação: _____ (anos)

Abortos: _____ (Espontâneos: _____ Induzidos: _____)

Idade do aborto espontâneo: _____ (anos) _____ (anos)

E14 - Se não consegue ou conseguia engravidar, isso se deve à:

(1) Motivo desconhecido (2) Fator Masculino (3) Tubário (4) Insuficiência Ovariana (5)

Outros: _____

E15 - Você já fez algum tratamento para engravidar?

(0) Não (1) Indução Ovulatória (2) Inseminação Intra-uterina (3) Fertilização In Vitro

E16 - Você já amamentou? (0) Não (1) Sim.**E17 - Quanto tempo você amamentou? (soma de todos os filhos)** _____ anos e _____ meses**E18 - Você utiliza, ou utilizou na vida, algum Método Anticoncepcional Prévio?**

(0) Não (1) Contraceptivo Oral (2) Tabela (3) Dia (4) Camisinha (5) Contraceptivo injetável

Nome da pílula anticoncepcional ou do contraceptivo injetável	Dose	Idade ao início	Idade ao término	Tempo de uso em anos
		□□	□□	
		□□	□□	
		□□	□□	

(Nordette, Diane 35, Femiane, Triquilar, Microdiol, Trinordiol, Gynera, Selene, Yasmin, Yas, Qlaira, Perlutan/Mesygina, Depo-provera, Mirena, Nuvaring)

E19 - Você utilizou anticoncepcional via oral ou injetável por qual motivo?

(0) Nunca usei (1) Contraceção (2) Distúrbios menstruais (3) Dismenorreia

E20 - Uso de reposição hormonal:

(0) Não

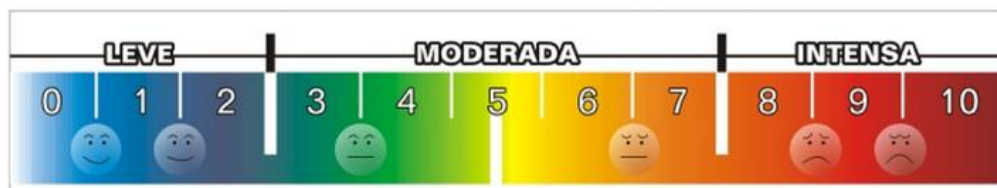
(1) Sim, alopática Qual? _____

(2) Sim, fitoterápica Qual? _____

(3) Sim, sem informação.

E21 - Tempo de uso de reposição hormonal _____ (anos)

Baseado na seguinte escala visual analógica de dor:



E22	Você sente ou sentia cólicas menstruais (dismenorréia)? Escala de dor n° _____	(0) Não (1) Sim, e não necessita de medicação. (2) Sim, e necessita de medicação para aliviá-las. (3) Sim, e necessita de medicação para aliviá-las, no entanto não melhoram. (4) Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas.
E23	Você sente cólicas que não apresentam relação nenhuma com o seu ciclo menstrual (Dor Pélvica)? Escala de dor n° _____	(0) Não (1) Sim, e não necessita de medicação. (2) Sim, e necessita de medicação para alivia-las. (3) Sim, e necessita de medicação para alivia-las, no entanto não melhoram (4) Sim, e necessita de medicação, no entanto elas não melhoram e já precisou ir ao Pronto Socorro, ou faltar ao trabalho em decorrência das mesmas.
E24	Você sente ou sentia dor durante o ato sexual (dispareunia)? Escala de dor n° _____	(0) Não (1) Na penetração (2) De profundidade (Dor no fundo da vagina) -
E25	Você sente alterações intestinais relacionadas com a menstruação?	(0) Não (1) Dor - Escala de dor n° _____ (2) Sangramento (3) Intestino Solto (4) Intestino Preso
E26	Você sente alterações urinárias relacionadas com a menstruação?	(0) Não (1) Dor - Escala de dor n° _____ (2) Sangramento (3) Aumento da frequência
E27	Qual o principal sintoma que a incomoda?	(0) Nenhum (1) Dismenorreia (2) Dor Pélvica (3) Dispareunia (4) Infertilidade (5) Alteração Intestinal Cíclica (6) Alteração Urinária Clínica

F - História de Endometriose na família

F1 - Algum familiar em 1º grau apresentou Endometriose?

(0) Não (1) Sim (Se, Sim especificar) (2) Não sabe

(SE 'NÃO'/'NÃO SABE',

PULE SESSÃO "G")

F2 - Tipo de familiar:

(1) mãe(2) irmã(3) filha(4) Tia Materna sanguínea (5) Tia Paterna sanguínea (6) Avó Paterna (7) Avó Materna

G - História de Câncer na família

G1 - Algum familiar em 1º grau apresentou Câncer?(0) Não (1) Sim (Se, Sim especificar) (2) Não sabe **(SE 'NÃO'/'NÃO SABE',****PULE SESSÃO "H")****G2 - Tipo de familiar:**(1) Mãe(3) irmã (5) filha (7) Tia Materna sanguínea (9) Tia Paterna sanguínea (11) Avó Paterna
(13) Avó Materna(2) Pai(4) irmão (6) filho (8) Tio Materno sanguínea (10) Tio Paterno sanguínea (12) Avô Paterno
(14) Avô Materno

Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer	Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer	Tipo de familiar	Local ou tipo de câncer
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	

H - Alguma vez o seu médico disse que você teve algumas das doenças abaixo?**H1 - Diabetes** (0) Não (1) Sim.**H2 - Obesidade** (0) Não (1) Sim.**H3 - Mioma** (0) Não (1) Sim.

Tratou? (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H4 - Doença Ovariana (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

Tratou? (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H5 - Cisto de mama (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H6 - Hiper ou Hipotireoidismo (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H7 - Algum tipo de câncer:(0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H8 - HIV(0) Não (1) Sim**H9 - Hepatite:** (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

H10 - Outra Comorbidade: (0) Não (1) Sim.

Qual? _____

I - Hábitos do Fumo**I1 - Já fumou pelo menos por 1 ano?** (0) Nunca fumou (1) Somente no passado (2) Sim, ainda fuma**(SE "NUNCA", VÁ PARA I2)**

A Sra. fumou cigarro, charuto, cachimbo ou maconha?	N.º de vezes que fumava por dia ou maços ao dia	Idade ao início	Idade ao término	Tempo de fumo em anos	Observação
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		
(1) Cigarro (2) Charuto (3) Cachimbo		□□□	□□□		

I2 - Já morou junto com um fumante (pai, irmão, mãe, marido, filhos, avos) ou trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?

(0) Não (1) Sim, em casa. (2) Sim, no trabalho.

I3 - Tempo em anos de exposição: □□□ Anos

Sua idade quando essa pessoa iniciou o fumo	Sua idade quando essa pessoa parou o fumo
□□□	□□□

J - Hábitos Alimentares

J1 - Qual a frequência com que come os seguintes alimentos e bebidas?

Unidade	Alimento	Nunca	Quantas vezes ao mês?	Quantas vezes por semana?	Quantas vezes ao dia?
1 copo	Leite		□□□	□	□□□
1 pote	Iogurte		□□□	□	□□□
1 porção	Manteiga		□□□	□	□□□
1 porção	Pão		□□□	□	□□□
1 porção	Arroz		□□□	□	□□□
1 porção	Massa		□□□	□	□□□
1 porção	Cereal de milho (Sucrilhos e etc.)		□□□	□	□□□
1 porção	Produtos de Soja		□□□	□	□□□
1 porção	Mandioca		□□□	□	□□□
1 porção	Carne bovina		□□□	□	□□□

1 porção	Porco		□□□	□	□□□
1 porção	Galinha Industrializada		□□□	□	□□□
1 porção	Galinha caipira		□□□	□	□□□
1 porção	Outra carne (ovelha)		□□□	□	□□□
1 porção	Peixe		□□□	□	□□□
1 porção	Presunto ou salame ou salsicha		□□□	□	□□□
1	Ovo		□□□	□	□□□
1 porção	Queijo		□□□	□	□□□
1 média	Batata		□□□	□	□□□
1 porção	Vegetais verdes não cozidos (saladas)		□□□	□	□□□
1 porção	Crucíferas (brócolis, repolho, etc)		□□□	□	□□□
1 média	Cenoura		□□□	□	□□□
1 média	Tomate (fresco da estação)		□□□	□	□□□
1 porção	Grãos (ervilha, feijão, lentilha)		□□□	□	□□□
1 porção	Em resumo, quantas vezes o(a) Sr(a) come uma porção de qualquer tipo de vegetal (exceto batata e cenoura)?		□□□	□	□□□
1 copo	Suco de frutas frescas		□□□	□	□□□
1 média	Maçã ou Pera		□□□	□	□□□
1 média	Fruta cítrica (laranja, limão, lima) na época de colheita		□□□	□	□□□
1 média	Banana		□□□	□	□□□
1 média	Em resumo, quantas vezes você come 1 fruta de qualquer tipo , fresca, por semana ?		□□□	□	□□□
1 fatia ou taça	Bolo e sobremesa		□□□	□	□□□
1 copo	Café		□□□	□	□□□
1 porção	Grão de Bico		□□□	□	□□□
1 porção	Alho		□□□	□	□□□

J2 - Qual o tipo de gordura usa predominantemente: Coloque (A) usa para cozinhar, (B) usa para temperar os vegetais e (C) usa para pães, torradas e biscoitos.

(1) azeite de oliva _ _	(5) margarina _ _	(9) girassol _ _	(13) outra gordura animal _ _
(2) azeite dendê _ _	(6) não usa gordura _ _	(10) óleo de soja _ _	(99) não sabe _ _
(3) azeite de coco _ _	(7) óleo de uva _ _	(11) outro óleo de semente _ _	
(4) manteiga _ _	(8) óleo de milho _ _	(12) banha de porco _ _	

J3 - Você ingere ou ingeriu vitaminas (fármaco)? (0) Não (1) Sim (3) Não sabe

J4 - Qual? (1) Poli vitamínico (2) Outros _____

J5 - Com que frequência toma estas vitaminas?

- (0) Nunca
- (1) Ocasionalmente
- (2) Uma vez por semana
- (3) Uma vez por mês
- (4) Diariamente

J6 - Por quanto tempo? _____ (meses)

K - Hábitos de bebida

K1 - Já ingeriu bebidas com álcool pelo menos 1 vez por mês?

(0) Nunca (1) Só no passado (2) Sim, ainda bebe **(SE “NUNCA”, PULE PARA SESSÃO “L”)**

K2 - Com que frequência bebe ou bebia? (1) Diariamente (2) Semanalmente (3) Quinzenalmente (4) Mensalmente (5) Em eventos e festas

Tipo de Bebida	Idade de início	Tempo de uso em anos
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	_ _	_ _
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	_ _	_ _
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	_ _	_ _
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licores (5)Whisky ou Vodca	_ _	_ _

L - Exercício Físico**L1 - Você pratica esporte ou exercício físico?**(0) Não (1) Sim, Atualmente.(2)Sim, No passado.**(SE “NÃO”, O QUESTIONÁRIO TERMINA AQUI)**

L2 - Qual esporte ou exercício físico você praticou mais frequentemente?	Horas Praticadas (por dia)	Frequência por semana	Tempo em anos
	□□:□□h	□□	□□
	□□:□□h	□□	□□
	□□:□□h	□□	□□

M - História Ocupacional

Ocupação/ Cargo	Tipo de companhia	Idade ao início	Idade ao término	Se há um período sem ocupação antes do trabalho 2, anote a razão
		□□	□□	
		□□	□□	
		□□	□□	
		□□	□□	

*Fim do questionário.***OBRIGADA POR SUA PARTICIPAÇÃO EM NOSSA PESQUISA!**

Rubrica da voluntária: _____

Rubrica da Entrevistadora: _____

ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HC-FMUSP**Hospital das Clínicas da FMUSP**
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq**Nº Protocolo: 0910/11****Título: CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES ENVOLVIDOS COM A PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA ENDOMETRIOSE****Pesquisador Responsável: Maurício Simões Abrão****Pesquisador Executante: Plínio Tostes Berardo****Co-autores: Jamila Perini, Daniel Escorsim Machado****Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 01/02/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 06 de Fevereiro de 2012


PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME**Coordenador****Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq**

ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HFSE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
HOSPITAL FEDERAL DOS SERVIDORES DO ESTADO

Rio de Janeiro, 25 de março de 2011.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Federal dos Servidores do Estado (CEP-HFSE).

Ao Ilmo Sr. Dr. Plínio Tostes Berardo Carneiro da Cunha.

Assunto: Aprovação do Protocolo CEP: 000.414.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HFSE, após analisar as respostas as pendências ao parecer consubstanciado do CEP de 13.09.10 e as respostas à carta do CEP-HFSE de 22.11.10, considerou aprovado com recomendação, o protocolo de pesquisa intitulado: "Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose", na Versão 10.08.10, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido, na versão 2.0 de 10.03.2011, cujo pesquisador principal é o Dr. Plínio Tostes Berardo Carneiro da Cunha, médico desta instituição, estando o mesmo de acordo com o que preconiza as Resoluções 196/96, 340/04 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), devendo o pesquisador principal:

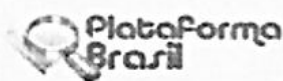
- 1- atentar para as recomendações contidas no Parecer Consubstanciado do CEP-HFSE;
- 2- observar que qualquer outra nova pesquisa utilizando o material biológico armazenado ou os dados obtidos dos sujeitos de pesquisa, necessitarão da elaboração de um novo protocolo de pesquisa com aprovação do CEP-HFSE, conforme o item III.12 da Resolução 340/04 do CNS;
- 3- comunicar ao CEP imediatamente em casos de eventos adversos ocorridos com os sujeitos de pesquisa, mesmo não se tratando de pesquisa com o envolvimento de fármacos;
- 4- comunicar ao CEP em casos de emenda ao protocolo de pesquisa ou ao TCLE e
- 5- enviar os relatórios da pesquisa nas datas estabelecidas na folha de rosto e segundo os critérios que se façam necessários pelo Comitê ou pelo pesquisador, assim como os termos de consentimento livre e esclarecidos, assinados pelos sujeitos de pesquisa, até a data do primeiro relatório parcial.

Dr. Marcos Henrique Manzoni
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos do HFSE

ANEXO F – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/HMF



MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose

Pesquisador: Jamila Alessandra Perini Machado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45941715.5.0000.5275

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.244.294

Considerações Finais a critério do CEP:

- 1) De acordo com o item VII.13.d, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa).
- 2) Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	08/09/2015 10:23:16	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/09/2015 10:30:38	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	08/09/2015 10:31:50	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/09/2015 10:37:04	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Outros	Pendencia.pdf	09/09/2015 15:07:41	Jamila Alessandra Perini Machado	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_498610.pdf	09/09/2015 15:08:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Setembro de 2015

Assinado por:

Ivo Basílio da Costa Júnior
(Coordenador)

