

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Mayara Calixto da Silva

**Efeito dos polimorfismos *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C* no desenvolvimento da endometriose**

Rio de Janeiro

2020

Mayara Calixto da Silva

**Efeito dos polimorfismos *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C* no desenvolvimento da endometriose**

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jamila Alessandra Perini Machado

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Vianna Jorge

Coorientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Daniel Escorsim Machado

Rio de Janeiro

2020

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

S586e Silva, Mayara Calixto da.  
Efeito dos polimorfismos PTGS2 -1195A>G e +8473 T>C no desenvolvimento da endometriose / Mayara Calixto da Silva. -- 2020.  
96 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientadora: Jamila Alessandra Perini Machado.  
Coorientadores: Rosane Vianna Jorge e Daniel Escorsim Machado.

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

1. Endometriose. 2. Saúde Pública. 3. Diagnóstico Precoce.  
4. Inflamação. 5. Polimorfismo Genético. I. Título.

CDD – 23.ed. – 618.1

Mayara Calixto da Silva

**Efeito dos polimorfismos *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C* no desenvolvimento da endometriose**

Dissertação 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 Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 04 de maio de 2020.

Banca Examinadora

Prof.º Dr.º Rômulo Medina de Mattos  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profª Dr(a). Rita de Cássia Elias Estrela Marins  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.º Dr.º Daniel Escorsim Machado (Terceiro orientador)  
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Profª Dr(a). Rosane Vianna Jorge (Segunda orientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profª Dr(a). Jamila Alessandra Perini Machado (Primeira orientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/ Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2020

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me permitir concluir mais uma etapa da realização de um sonho e por não me desamparar nos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha família por todo apoio durante toda minha vida, mas principalmente por acreditarem no meu potencial e por me incentivarem a conquistar meus objetivos.

À minha mãe, Adriana, e minha avó, Cícera, obrigada por serem meu porto seguro diante de tanta maldade que existe no mundo. Se hoje sou uma mulher forte e independente é graças à dedicação e amor incondicional de vocês duas. Ao meu padrasto, Marco, por cuidar da nossa família com tanto amor e carinho e por ser meu alívio cômico nos dias tristes. Ao meu namorado, Fernando, por todo amor, parceria e paciência durante nosso tempo juntos.

Aos meus amigos/irmãos da família LaPesF/LaPAC: Giuliana Rodrigues, Isabelle Alves, Jéssica Perini, Matheus Pereira, Marllow Caetano, obrigada pelo ambiente de afeto e companheirismo que construímos juntos. Obrigada pelas conversas sinceras, pelos risos e também pelas lágrimas de alegria e acolhimento nos dias difíceis. Em especial, agradeço aos meus melhores amigos Jéssica Vilarinho, que desde o meu primeiro dia no laboratório me acolheu de braços abertos, e Lucas Lopes, que esteve sempre ao meu lado durante a graduação e o mestrado. Vocês dois, a cada dia, me mostram o verdadeiro significado da palavra amizade.

À toda equipe dos hospitais de recrutamento das participantes do estudo, em especial aos Drs. Plínio Tostes, Renato Ferrari e Maurício Abrão, por toda colaboração e confiança depositada em nossa equipe para realização deste projeto.

À minha coorientadora Rosane, obrigada pela colaboração.

Ao Prof. Daniel Machado que, desde a graduação, me cativou para a área da biologia e, mais especificamente da endometriose. Obrigada por todos os ensinamentos valiosos durante nossos seminários e por ter me proporcionado, no ano de 2019, o desafio de ministrar aulas diferentes de tudo que eu já havia feito. Foi uma experiência incrível.

Finalmente, agradeço à minha orientadora, Jamila Perini, idealizadora deste projeto e responsável por grande parte do avanço profissional, pessoal e emocional pelos quais passei nos últimos anos. Obrigada por sempre enxergar o melhor em cada um de seus alunos e valorizar as qualidades de cada um de nós. Obrigada, também, por apontar nossos pontos fracos e nos dar oportunidade de evoluir como profissionais e seres humanos. Como já disse e repito, você é um exemplo a ser seguido de profissional, mulher, mãe e amiga.

*O sucesso é a capacidade de ir de um fracasso a outro sem perder o entusiasmo.*

WINSTON CHURCHILL

## RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica inflamatória que afeta 10% das mulheres em idade reprodutiva, causando sintomas de dor que podem comprometer a qualidade de vida das pacientes. A patogênese da endometriose não é totalmente compreendida, mas sabe-se que a inflamação desempenha um papel importante, principalmente via enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), que é superexpressa em lesões endometrióticas. A COX-2 é codificada pelo gene da prostaglandina-endoperoxidase sintase 2 (*PTGS2*) e dois polimorfismos (*PTGS2* -1195 A>G e +8473 T>C) destacam-se por diminuir ou aumentar a expressão do gene, respectivamente, e pela frequência elevada na população brasileira. Este estudo teve como objetivo avaliar o papel potencial dos SNPs *PTGS2* -1195 A>G e +8473 T>C no desenvolvimento da endometriose e sua associação com as características prognósticas da doença. Pacientes diagnosticadas com endometriose por cirurgia ou ressonância magnética (N = 254) e mulheres sem evidência da doença/controles (N = 267) foram recrutadas em dois hospitais de referência do sistema público de saúde do Rio de Janeiro, em clínicas especializadas para o tratamento da endometriose. Sangue periférico (3 mL) foi coletado de todas as participantes e utilizado para extração de DNA para análises de genotipagem dos polimorfismos do *PTGS2* (-1195A>G e +8473T>C). Os genótipos individuais foram identificados usando ensaios de discriminação alélica *TaqMan*. A associação entre os polimorfismos e as características da endometriose foi avaliada por regressão logística multivariada, utilizando as *odds ratio* ajustadas (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Houve diferenças significativas entre os casos e controles em relação à idade ( $P < 0,001$ ), IMC ( $P = 0,001$ ), escolaridade ( $P < 0,001$ ), atividade física ( $P = 0,003$ ), tabagismo ( $P < 0,001$ ), contracepção ( $P = 0,002$ ), dismenorria ( $P < 0,001$ ), dor pélvica crônica não cíclica ( $P < 0,001$ ), dispareunia profunda ( $P < 0,001$ ), queixas cíclicas intestinais ( $P < 0,001$ ) e urinárias ( $P < 0,001$ ) e infertilidade ( $P < 0,001$ ). Em relação aos SNPs do *PTGS2*, apenas a distribuição do -1195 A>G foi estatisticamente diferente entre casos e controles ( $P = 0,04$ ), sugerindo um menor risco de desenvolver a doença para as mulheres com genótipo -1195GG (OR = 0,19; IC95% = 0,04 - 0,93). Não houve diferenças significativas em relação aos SNPs do *PTGS2* e às características prognósticas da doença. Como conclusão, o SNP *PTGS2*-1195 A>G parece afetar o desenvolvimento da endometriose, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da doença e possivelmente auxiliar na orientação do tratamento individualizado das mulheres com endometriose.

**Palavras-Chave:** Endometriose, Diagnóstico, *PTGS2*, COX-2, Polimorfismos.

## ABSTRACT

Endometriosis is an inflammatory gynecological disease that affects 10% of women in reproductive age, causing pain symptoms that may compromise their quality of life. The pathogenesis of endometriosis is not fully understood, but it is known that inflammation plays an important role, mostly via the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, which is overexpressed in endometriotic lesions. COX-2 is encoded by the prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 gene (*PTGS2*) and two polymorphisms (*PTGS2* -1195 A>G and +8473 T>C) stand out for decrease or increase gene expression, respectively, and the high frequency in the Brazilian population. This study aimed to evaluate the potential role of *PTGS2* -1195 A>G and +8473 T>C SNPs in the development of endometriosis and its association with the prognostic characteristics of the disease. Patients diagnosed with endometriosis by surgery or magnetic resonance imaging (N = 254) and women without evidence of the disease/controls (N = 267) were recruited from two reference hospitals in the public health system in Rio de Janeiro, in specialized clinics for the treatment of endometriosis. Peripheral blood (3 mL) was collected from all participants and used for DNA extraction for genotyping analyzes of *PTGS2* polymorphisms (-1195A>G and +8473T>C). Individual genotypes were identified using *TaqMan* allelic discrimination assays. The association between the polymorphisms and endometriosis features was assessed by multivariate logistic regression, using adjusted odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI). There were significant differences between cases and controls in relation to age ( $P < 0.001$ ), BMI ( $P = 0.001$ ), education ( $P < 0.001$ ), physical activity ( $P = 0.003$ ), smoking ( $P < 0.001$ ), contraception ( $P = 0.002$ ), dysmenorrhea ( $P < 0.001$ ), chronic non-cyclical pelvic pain ( $P < 0.001$ ), deep dyspareunia ( $P < 0.001$ ), cyclic intestinal ( $P < 0.001$ ) and urinary complaints ( $P < 0.001$ ) and infertility ( $P < 0.001$ ). Regarding the *PTGS2* SNPs, only the distribution of -1195 A>G was statistically different between cases and controls ( $P = 0.04$ ), suggesting a lower risk of developing the disease for women with the -1195GG genotype (OR = 0.19; 95% CI = 0.04 - 0.93). There were no significant differences in relation to the *PTGS2* SNPs and the prognostic characteristics of the disease. In conclusion, the *PTGS2* -1195 A>G SNP seems to affect the development of endometriosis, which can contribute to a better understanding of the pathogenesis of the disease and possibly assist in guiding the individualized treatment of women with endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis, Diagnosis, *PTGS2*, COX-2, Polymorphisms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Frequência dos sintomas individuais e concomitantes da endometriose em uma coorte de 1000 mulheres da população mundial. ....	15
<b>Figura 2:</b> Critérios sugeridos para indicação de tratamento cirúrgico de endometriose superficial. ....	20
<b>Figura 3:</b> Fenômeno da menstruação retrógrada e o desenvolvimento da endometriose.....	22
<b>Figura 4:</b> Principais componentes da via de conversão do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases. ....	24
<b>Figura 5:</b> Regulação do microambiente inflamatório na endometriose. ....	25
<b>Figura 6:</b> Estrutura genômica do gene <i>PTGS2</i> e localização dos SNPs <i>PTGS2 -1195A&gt;G</i> e <i>+8473 T&gt;C</i> . ....	26
<b>Figura 7:</b> Exemplo da determinação dos genótipos de <i>PTGS2 -1195A&gt;G</i> (A) e <i>VEGF -2578C&gt;A</i> (B), por PCR em tempo real (Sistema Taqman). ....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação da endometriose proposta por Nisolle e Donnez (1997). .....	17
<b>Tabela 2:</b> Estadiamento da endometriose proposto pela revista American Fertility Society, 1996. ....	18
<b>Tabela 3:</b> Frequência dos genótipos e alelos variantes dos SNPS <i>PTGS2 -1195A&gt;G</i> e <i>+8473T&gt;C</i> na população saudável.....	28
<b>Tabela 4:</b> Associações encontradas entre o SNP <i>PTGS2 -1195 A&gt;G</i> e a endometriose em estudos já publicados.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l	Microlitro
A	Adenina
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroides
ASRM	American Society of Reproductive Medicine (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
C	Citosina
CA 125	Cancer antigen 125 (Antígeno de câncer 125)
cm	Centímetro
c-MYB	Proteína c-MYB
COX-2	Enzima ciclooxygenase-2
CYP19A1	Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (Citocromo P450 Família 19 Subfamília A Membro 1)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EPI	Endometriose Profunda Infiltrativa
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Guanina
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone (Hormônio liberador de gonadotrofina)
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HMF	Hospital Morcorvo Filho
HWE	Hardy–Weinberg equilibrium (Equilíbrio de Hardy-Weinberg)
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
IL-17A	Interleucina 17 tipo A
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 tipo beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
ISCA	Infertilidade sem causa aparente
kb	Kilobase
mL	Mililitro

NF-kB	Nuclear Factor kappa B (Fator nuclear kappa B)
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
OMA	Endometriose Ovariana
OR	Odds Ratio (Razão de chance)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PGE2	Prostaglandina 2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 alfa
PNAISM	Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (Gene da prostaglandina-endoperoxidase sintase 2)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RM	Ressonância Magnética
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de um único nucleotídeo)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Pacote Estatístico para Ciências Sociais)
SUP	Endometriose Superficial
<i>T</i>	Timina
<i>TATA box</i>	Sítio de repetição de timina e adenina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UEZO	Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
UTR	Untranslated Region (Região não traduzida)
$\chi^2$	Teste Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE.....	14
2.2. ENDOMETRIOSE E SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL .....	15
2.3. DIAGNÓSTICO.....	16
2.4. CLASSIFICAÇÃO E ESTADIAMENTO .....	17
2.5. TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE.....	18
2.6. ETIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE.....	21
2.7. PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA ENDOMETRIOSE .....	23
2.8. GENE DA COX-2 E SEUS POLIMORFISMOS .....	26
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. OBJETIVO GERAL.....	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	32
5.2. DESENHO E POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	32
5.3. COLETA DE DADOS .....	32
5.4. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO .....	33
5.5. EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS .....	33
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>79</b>
10.1. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HFSE .....	79
10.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HMF .....	80
10.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HFSE .....	82
10.4. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HMF .....	86
10.5. QUESTIONÁRIO .....	90
10.6. CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica inflamatória crônica, caracterizada pela presença de glândulas e estroma do tipo endometrial fora do útero (BURNEY e GIUDICE 2012; RICCIO et al., 2018). A endometriose provoca diversos sintomas, que podem afetar negativamente a vida das pacientes, dentre os quais o mais frequente é a dismenorreia, que afeta entre 79-97% das mulheres, seguido pela dispareunia (44-71%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-40%) e alterações intestinais e urinárias cíclicas (29%) (FAUCONNIER et al., 2013; PERINI et al., 2014; CARDOSO et al., 2017a; CARDOSO et al., 2017b; CARDOSO et al., 2017c; CARDOSO et al., 2019).

O diagnóstico da endometriose pode ser feito através de métodos de imagem, no caso de lesões profundas (NÁCUL e SPPRITZER, 2010). Entretanto, as lesões superficiais ainda necessitam ser investigadas através de cirurgia, que pode ser laparotomia ou laparoscopia, que são métodos onerosos, invasivos e com potenciais riscos para a paciente, mas que permitem a inspeção direta da cavidade, com visualização dos implantes para posterior confirmação histológica da doença (ASRM, 1996; MAY et al., 2011). Apesar da alta prevalência dos sintomas, cerca de 10% das mulheres com endometriose são assintomáticas, o que dificulta e posterga o diagnóstico (MORADI et al., 2014; PERINI et al., 2014; CARDOSO et al., 2017; CARDOSO et al., 2017b; CARDOSO et al., 2017c; CARDOSO et al., 2019).

A conduta terapêutica das mulheres com diagnóstico da doença, na maioria dos casos, se inicia com o tratamento medicamentoso, combinando anti-inflamatórios, contraceptivos e análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), promovendo o alívio dos sintomas de dor (NÁCUL e SPRITZER, 2010; FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015). Entretanto, mulheres com dor incapacitante não responsiva ao tratamento medicamentoso, casos de infertilidade sem causa aparente (ISCA) com suspeita de endometriose e sem resposta à fertilização in vitro (FIV) (SINGH et al., 2017; KHO et al., 2018), endometriose ovariana com risco de evolução maligna ou lesões profundas e infiltrativas com acometimento do intestino ou vias urinárias com risco de comprometimento funcional são aconselhadas a realizar o tratamento cirúrgico para remoção dos focos da doença (ABRÃO et al., 2008; CHAÂBOUNI et al., 2009; MOTA et al., 2015; MAGGIORE et al., 2017; SINGH et al., 2017; KHO et al., 2018).

O surgimento da endometriose pode ser explicado, em parte, pela teoria da menstruação retrógrada proposta por Sampson (1927), segundo a qual, a menstruação sofre refluxo pelas tubas uterinas, levando células endometriais ao peritônio e órgãos adjacentes onde conseguem se proliferar e aderir ao local (SAMPSON, 1927). Entretanto, apenas uma parte das mulheres

que possuem menstruação retrógrada desenvolve a endometriose (REDWINE, 2002; BRICOU et al., 2008; FERRERO et al., 2015), o que demonstra que outros mecanismos também estão envolvidos na etiologia da doença, como fatores genéticos e imunológicos (KOBAYASHI et al., 2013).

A endometriose é uma doença inflamatória e, portanto, regulada por diversos fatores envolvidos neste processo (ATTAR e BULUN, 2006; MAIA JR et al., 2012). Nesse cenário, destaca-se a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), que atua diretamente na cascata inflamatória, convertendo ácido araquidônico em prostaglandinas em resposta à inflamação (SMITH et al., 1996). Já foi demonstrado que a COX-2 está mais expressa em lesões endometrióticas, em comparação ao endométrio eutópico de mulheres com a doença (CHISHIMA et al., 2002; BUKULMEZ et al., 2008; CARRARELLI et al. 2016), e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose em comparação ao de mulheres sem a doença (MATSUZAKI et al., 2004). Assim, acredita-se que, nestas mulheres, as células endometriais que sofrem fluxo retrógrado se deparam com um sistema imunológico “defeituoso” e que não consegue lidar com estas células recém-chegadas (MAIA JR et al., 2009).

A COX-2 é codificada pelo gene da prostaglandina-endoperoxidase sintase 2 (*PTGS2*) e sua expressão varia naturalmente entre indivíduos, o que pode ser atribuído à presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em regiões funcionais do gene (COK e MORRISON, 2001, PAPAFILEI et al., 2002). Sendo assim, diversos estudos investigam a influência de polimorfismos no *PTGS2* na expressão da COX-2 (ZHANG et al., 2005; MOORE et al., 2012; PIRANDA et al., 2017) e também a influência de polimorfismos deste gene no desenvolvimento da endometriose (JUO et al., 2009; KIM et al., 2012; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016). O gene *PTGS2* é polimórfico, e dois polimorfismos (-1195 A>G e +8473 T>C) se destacam por sua elevada frequência na população brasileira (11,7% - 21,2% e 30,5% - 39,8%, respectivamente) (PIRANDA et al., 2010; FURUYA et al., 2018; KUCHLER et al., 2019) e por sua possível ação biológica (ZHANG et al., 2005; MOORE et al., 2012).

Sendo assim, em decorrência da alta prevalência, do diagnóstico invasivo, oneroso e, geralmente, tardio da endometriose, além da etiopatogenia pouco esclarecida, surge a hipótese de estudar polimorfismos em genes que regulam a inflamação, tais como o *PTGS2* -1195A>G e +8473 T>C no desenvolvimento da endometriose, a fim de buscar compreender o mecanismo de desenvolvimento da doença e contribuir para um tratamento individualizado baseado no perfil inflamatório destas pacientes.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma doença ginecológica benigna, caracterizada pela presença de tecido endometrial (estromal e/ou glândular) funcional, fora da cavidade uterina, provocando uma reação inflamatória crônica (ABRÃO et al., 2000; GIUDICE e KAO, 2004). Os principais órgãos acometidos pela doença são o peritônio, os ovários, ligamentos útero-sacros, região retro cervical, septo reto-vaginal, reto/sigmoide, intestino delgado (íleo terminal), apêndice, bexiga e ureteres (GIUDICE e KAO, 2004).

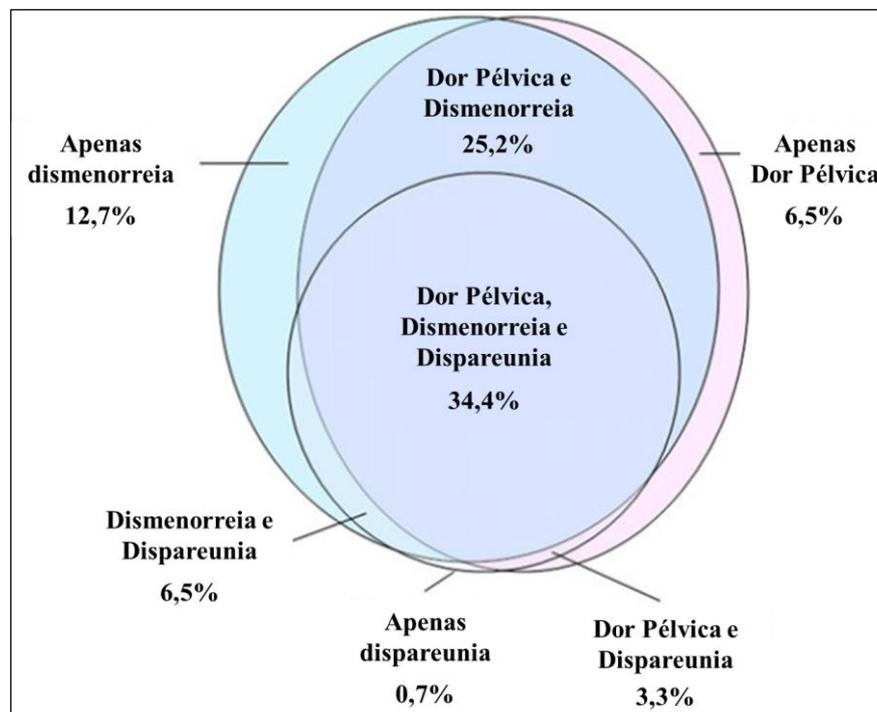
A endometriose pode se desenvolver precocemente, durante os primeiros meses após a menarca, e persistir até depois da menopausa, fazendo com que algumas mulheres convivam com a doença por longos períodos de tempo, até mesmo por décadas (BROSENS, GORDTS e BENAGIANO, 2013). Por conta disso, a endometriose é uma doença com alta prevalência, com estimativa de que 1 a cada 10 mulheres em idade reprodutiva (aproximadamente 200 milhões de mulheres no mundo) estejam convivendo com a doença (ROGERS et al., 2009). Em mulheres com infertilidade a prevalência é ainda maior, podendo chegar a 50% entre mulheres com ciclo menstrual regular e parceiros saudáveis (MEULEMAN et al., 2009).

Alguns fatores são conhecidos por influenciar o risco de desenvolvimento da endometriose, seja aumentando ou diminuindo esse risco em uma determinada população. Dentre os fatores conhecidos por aumentar o risco de desenvolver a doença, destacam-se aqueles responsáveis por aumentar a exposição ao estrogênio, como fluxo menstrual longo (8 dias ou mais), menarca precoce, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (ABRÃO, 2000; PILLET et al., 2012; NNOAHAM et al. 2012; SHAFRIR et al., 2018). Por outro lado, condições que reduzem a exposição ao estrogênio possuem efeito oposto, reduzindo o risco de desenvolver endometriose, como a prática de exercícios físicos, alta paridade, dieta hipocalórica e o tabagismo (PARAZZINI et al. 2004; HEILIER et al. 2007; VITONIS et al. 2010; SHAFRIR et al., 2018). Outro fator a ser considerado é o baixo IMC (Índice de Massa Corporal), que já foi descrito em diversos artigos em associação inversa com o desenvolvimento da endometriose, entretanto, a explicação biológica para esta associação permanece um enigma (PILLET et al., 2012; SHAH et al., 2013; PERINI et al., 2014; CARDOSO et al., 2016; SHAFRIR et al., 2018).

Por ser uma doença inflamatória, os principais sintomas da endometriose estão relacionados à dor. O sintoma mais frequente é a dismenorreia, que afeta entre 79-97% das mulheres, seguido pela dispareunia (44-71%), dor pélvica crônica (22-69%), infertilidade (25-

40%) e alterações intestinais e urinárias cíclicas (29%). Apesar da alta prevalência dos sintomas, cerca de 10% das mulheres com endometriose são assintomáticas, o que dificulta e posterga o diagnóstico (OZKAN et al., 2008; FAUCONNIER et al., 2013; MORADI et al., 2014). Um estudo realizado em 2008, pela Universidade de Oxford, no Reino Unido, avaliou a prevalência dos principais sintomas da endometriose em uma amostra de 1000 pacientes da população mundial, demonstrada na figura 1. Foi observado que, além da alta prevalência dos sintomas da endometriose, a maioria da paciente possui os 3 principais sintomas de dor (dor pélvica, dimenorreia e dispareunia) concomitantemente (SINAI et al., 2008).

Figura 1: Frequência dos sintomas individuais e concomitantes da endometriose em uma coorte de 1000 mulheres da população mundial.



Fonte: Adaptado de Sinaii e cols. (2008).

Devido à alta ocorrência dos sintomas, principalmente dor pélvica crônica e infertilidade, a endometriose pode comprometer a qualidade de vida das mulheres e levar a um desgaste físico e mental (BALLARD et al., 2006). Outros agravantes são as frequentes falhas e atrasos do diagnóstico, que levam em média 6 a 8 anos, e que aumentam o tempo de exposição aos sintomas (NNOAHAM et al. 2011; STAAL et al. 2016; MORADI et al. 2014).

## 2.2. ENDOMETRIOSE E SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL

Devido à alta prevalência, etiopatogenia pouco conhecida, cronicidade e morbidade, a endometriose é considerada um problema de saúde pública. Por isso, o Ministério da Saúde do

Brasil estabeleceu o Protocolo Clínico e as Diretrizes Terapêuticas da Endometriose, pela Portaria nº 879, de 12 de julho de 2016. A portaria dispõe de um anexo, que se trata de uma revisão bibliográfica, trazendo informações gerais sobre a endometriose, critérios de diagnóstico, tratamento e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Por isso, indica-se a utilização deste protocolo pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e Municípios brasileiros, bem como a conscientização das pacientes quanto aos potenciais riscos do procedimento preconizado (BRASIL, 2016).

Por ser uma doença que afeta a qualidade de vida das mulheres, algumas políticas públicas foram adotadas para esta população no Brasil. Em 2004, foi implantado pelo Ministério da Saúde a Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher (PNAISM) com objetivo de ampliar e qualificar a atenção clínico-ginecológica, inclusive para as portadoras da infecção pelo HIV e outras DSTs. As metas específicas do PNAISM são: (i) diminuir a morbimortalidade por doenças crônico-degenerativas na população feminina, principalmente por doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus*; (ii) reduzir a morbimortalidade por Aids na população feminina; e (iii) implantar a atenção qualificada às mulheres com queixas clínico-ginecológicas (BRASIL, 2004). Entretanto, a endometriose não é citada no PNAISM, sendo apenas contemplada no atendimento às mulheres com doenças crônicas e queixas clínico-ginecológicas.

### 2.3. DIAGNÓSTICO

Durante os exames físicos as pacientes reportam os sintomas que podem indicar a presença da endometriose. Nesses casos, é indicada a realização de exames de imagem para confirmar o diagnóstico, como por exemplo a Ressonância Magnética (RM) (NÁCUL e SPPRITZER, 2010). A RM possui maior precisão do que outros métodos de imagem disponíveis, tais como ultrassonografia transvaginal, ultrassonografia endoanal, enema de bário, cistoscopia e retoscopia (ITO et al., 2016), além disso, a capacidade multiplanar e de contraste superior dos tecidos moles da RM são extremamente úteis principalmente na detecção da endometriose profunda (BIANEK-BODZAK et al. 2013). Apesar da boa acurácia da RM para diagnóstico da endometriose profunda, a endometriose superficial não pode ser detectada por esse método (BIANEK-BODZAK et al. 2013; ITO et al., 2016).

Sendo assim, o padrão ouro para o diagnóstico da endometriose, atualmente, ainda é a cirurgia, que pode ser laparotomia ou laparoscopia, com a inspeção direta da cavidade e visualização dos implantes para posterior confirmação histológica da doença (ASRM, 1996; MAY et al., 2011). Dentre essas, no entanto, a laparoscopia ainda é preferível, por causar menos

dor durante o pós-operatório, necessitar de menos tempo de internação após o procedimento, além de provocar uma cicatriz consideravelmente menor do que na laparotomia (PODGAEC, 2014; KHO et al., 2018). Entretanto, apesar das vantagens em relação a outros métodos, a laparoscopia é um método oneroso e invasivo, com potenciais riscos para a paciente (MAY et al., 2011).

Apesar da extensiva pesquisa na área da medicina, o diagnóstico definitivo da endometriose ainda depende de métodos invasivos e dispendiosos, uma vez que não existe um biomarcador específico para a doença. Entretanto, alguns médicos ainda solicitam a dosagem do antígeno de câncer 125 (CA 125) para complementar o diagnóstico (ABRÃO, 2000; RUAN et al., 2015), porém, este biomarcador possui baixa especificidade diagnóstica, pois se mostra elevado em outras patologias como cirrose hepática, câncer de ovário, doença pulmonar intersticial, bem como em doenças benignas ou malignas que afetam a pleura, o pericárdio e o peritônio, que derivam do epitélio celômico (que naturalmente produz CA-125) (DONG et al., 2014, KUMARI, 2018). Até o momento, os dados da literatura não foram suficientes para determinar um biomarcador diagnóstico para a endometriose com precisão suficiente para considerar sua utilização na prática clínica (FLORES et al., 2018).

#### 2.4. CLASSIFICAÇÃO E ESTADIAMENTO

Após a cirurgia e avaliação pelo médico, os focos da endometriose são classificados de acordo com a localização. Segundo Nisolle e Donnez (1997), os focos peritoneais podem ser classificados em superficiais (SUP), os focos ovarianos, caracterizados por cistos chocolate ligeiramente aderidos ao peritônio, são classificados em endometrioma ovariano (OMA) e, por fim, as lesões profundas que podem infiltrar até o útero, intestino ou septo reto-vaginal são classificadas como endometriose profunda infiltrativa (EPI) (Tabela 1). Há casos em que endometriose superficial ou ovariana podem estar associadas também a lesões infiltrativas, sendo classificadas apenas como EPI (NISOLLE E DONNEZ, 1997).

Tabela 1: Classificação da endometriose proposta por Nisolle e Donnez (1997).

<b>Classificação</b>	<b>SUP</b>	<b>OMA</b>	<b>EPI</b>
<b>Características</b>	Peritoneal	Cistos chocolate ligeiramente aderidos ao lado posterior do peritônio	Pode causar uma infiltração até o útero, intestino ou septo reto-vaginal

Fonte: Própria

Além da classificação da endometriose quanto ao local acometido, também existe o

estadiamento, descrito pela *American Fertility Society*, que está relacionado ao avanço clínico da doença. Os estágios são de I a IV e as principais características de cada estágio estão descritos na tabela 2 (ASRM, 1996).

Tabela 2: Estadiamento da endometriose proposto pela revista *American Fertility Society*, 1996.

Estadiamento	I (Mínima)	II (Leve)	III (Moderada)	IV (Severa)
<b>Características</b>	Implantes isolados e sem aderências significantes	Implantes superficiais com menos de 5 cm, sem aderências significativas	Múltiplos implantes aderências peritubárias e periovarianas evidentes	Múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes

Fonte: Própria

## 2.5. TRATAMENTO DA ENDOMETRIOSE

A conduta terapêutica das mulheres com diagnóstico clínico e por imagem, na maioria dos casos, se inicia com o tratamento medicamentoso com objetivo de amenizar os sintomas de dor (NÁCUL e SPRITZER, 2010; FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015). A dor provocada pela endometriose é provocada por níveis elevados de citocinas, prostaglandinas e interleucinas encontrados nessas pacientes (RAFIQUE e DECHERNEY, 2017). Sendo assim, como primeira opção de tratamento estão as prescrições de Anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), as combinações estroprogestogênicas (principalmente os contraceptivos orais combinados - COCs) e os progestógenos isolados (FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015; FERRERO et al., 2018a).

Os AINEs agem reduzindo a produção de prostaglandinas por meio da inibição da enzima cyclooxygenase-2 (COX-2), responsável pela síntese destes mediadores inflamatórios e, portanto, aliviam as dores causadas pela endometriose (SMITH et al., 1996; RAFIQUE e DECHERNEY, 2017; FERRERO et al., 2018a). O uso destes medicamentos possui algumas vantagens como a eficácia comprovada, baixo custo e fácil aquisição, porém, também possuem a desvantagem de provocarem efeitos adversos (náusea, diarreia, dores de cabeça e tontura, por exemplo) e, principalmente, por tratarem apenas os sintomas e não terem ação nas lesões endometrióticas (BROWN et al., 2017; FERRERO et al., 2018b).

A eficácia dos COCs no tratamento de dor associada à endometriose foi demonstrada pela primeira vez por Vercellini e colaboradores (1993), num estudo clínico randomizado. As pacientes foram tratadas com um análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH),

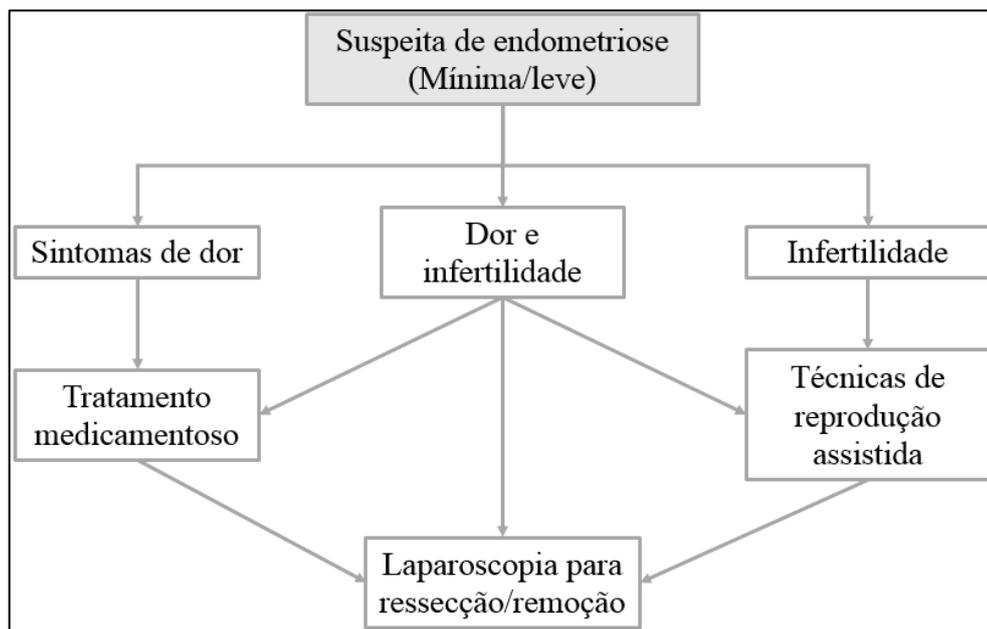
terapia comumente utilizada na época, ou com um COC cíclico de baixa dose (0,02mg de etinilestradiol e 0,15mg de desogestrel) e acompanhadas durante seis meses. Ao fim do seguimento do estudo foi constatado que ambos os tratamentos reduziram os sintomas dispareunia e dor pélvica não cíclica. Além disso, houve redução significativa também na dismenorreia no grupo tratado com o COC, que não pôde ser avaliada no grupo tratado com análogo de GnRH, que causa amenorreia (VERCELLINI et al., 1993; TAFI et al., 2015).

Atualmente, sabe-se também que a administração contínua dos COCs provoca um melhor controle da dor, em comparação com a administração cíclica. Entretanto, as mulheres que o administram por longos períodos possuem maior risco de desenvolver tromboembolismo, altas taxas de recorrência após descontinuação do uso e fertilidade comprometida devido à ação contraceptiva (RAFIQUE e DECHERNEY, 2017). Tanto as combinações estroprogestogênicas quanto os progestógenos isolados, além de serem eficazes no tratamento da dor, também atuam provocando decidualização do tecido endometriótico e são prescritos com o objetivo de impedir a progressão da doença (RAFIQUE e DECHERNEY, 2017).

Quando a paciente não apresenta resposta às terapias de primeira linha, passam a ser indicados os análogos de GnRH, que atuam inibindo o crescimento dos implantes de endometriose (NÁCUL e SPRITZER, 2010; FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015; FERRERO et al., 2018a; FERRERO et al., 2018b). Entretanto, os análogos de GnRH possuem uma série de efeitos adversos e, por isso, os medicamentos que associam estrogênio e progesterona em diferentes doses são preferíveis por causarem menos desses efeitos, além de serem sabidamente eficazes no tratamento da dor associada à doença (MARQUI, 2015).

O tratamento medicamentoso da endometriose consiste apenas no alívio dos sintomas, uma vez que não existe nenhum medicamento capaz de erradicar os focos da doença (ABRÃO et al., 2003; NÁCUL e SPRITZER, 2010). Sendo assim, alguns casos de endometriose superficial precisam ser tratados cirurgicamente, como de mulheres com dor incapacitante não responsiva ao tratamento medicamentoso, acometimento do intestino ou vias urinárias com risco de comprometimento funcional e casos de infertilidade sem causa aparente (ISCA) com suspeita de endometriose e sem resposta à fertilização in vitro (FIV) (SINGH et al., 2017; KHO et al., 2018). Os critérios sugeridos para indicação de tratamento cirúrgico de endometriose superficial estão resumidos na figura 2.

Figura 2: Critérios sugeridos para indicação de tratamento cirúrgico de endometriose superficial.



Fonte: Adaptado de Kho e cols. (2018)

Em mulheres com endometriose ovariana, a escolha pelo tratamento cirúrgico é mais difícil. Isso ocorre devido a diversos fatores que devem ser levados em consideração: sintomas de dor, idade da paciente, desejo de conceber e histórico de tratamento, tamanho do endometrioma, bilateralidade, cirurgia prévia no ovário que possa ter influenciado na reserva ovariana, e suspeita de evolução maligna (KHO et al., 2018). Cada caso deve ser avaliado individualmente, baseado no histórico e nas necessidades da paciente, o que resultará na escolha ou não pela cirurgia, além da indicação por procedimentos simples como drenagem, até procedimentos mais complexos como a ooforectomia (DE LA TORRE et al., 2017; KHO et al., 2018).

No tratamento da endometriose profunda, a indicação para tratamento cirúrgico varia de acordo com o local acometido e o grau de acometimento. Em resumo, as lesões no íleo e no apêndice requerem excisão cirúrgica devido ao risco de obstrução e surgimento de tumor carcinoide, respectivamente (CHAÂBOUNI et al., 2009; MOTA et al., 2015). Lesões intestinais maiores que 3 cm, casos de múltiplas lesões ou comprometimento da camada submucosa, por exemplo, também devem ser encaminhados para cirurgia, nesse caso a ressecção (ABRÃO et al., 2008). No caso de EPI na bexiga, diagnosticada por imagem, a cirurgia só é indicada para mulheres com dor severa, falha no tratamento medicamentoso, obstrução uretral ou em casos de recusa ou contra-indicação de uso de terapia hormonal (MAGGIORE et al., 2017).

O tratamento cirúrgico da doença também pode ser feito no momento do diagnóstico,

pois além de permitir a identificação da endometriose, a videolaparoscopia também possibilita a remoção completa dos focos da doença (KHO e ABRÃO, 2012). Durante a cirurgia, o médico pode optar tanto por procedimentos de baixa complexidade, como cauterização dos focos superficiais e aderências, quanto por procedimentos mais complexos nos ovários, intestino e bexiga, por exemplo (KHO e ABRÃO, 2012).

Um grande problema em relação ao tratamento cirúrgico da endometriose é a alta taxa de recorrência mesmo após a cirurgia. Além de ser um procedimento oneroso e invasivo, mulheres que passaram pela laparoscopia para remoção cirúrgica das lesões de endometriose possuem uma taxa de recorrência de mais de 40% em 5 anos (VIGNALI et al., 2005; BOZDAG, 2015). As taxas de recorrência variam de acordo com o local acometido e com o tempo decorrido após o tratamento. A maior taxa de recorrência em 4 anos é observada em mulheres com endometriose profunda (30,6%), seguida das mulheres com endometriose ovariana (24,6%) e endometriose peritoneal (17,8) (BUSACCA et al., 2006; BOZDAG, 2015). Após 8 anos, a recorrência é ainda maior, com 43,4% para endometriose profunda, 42% para ovariana e 24,1 para peritoneal (PARAZZINI et al., 2005; BOZDAG, 2015).

## 2.6. ETIOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

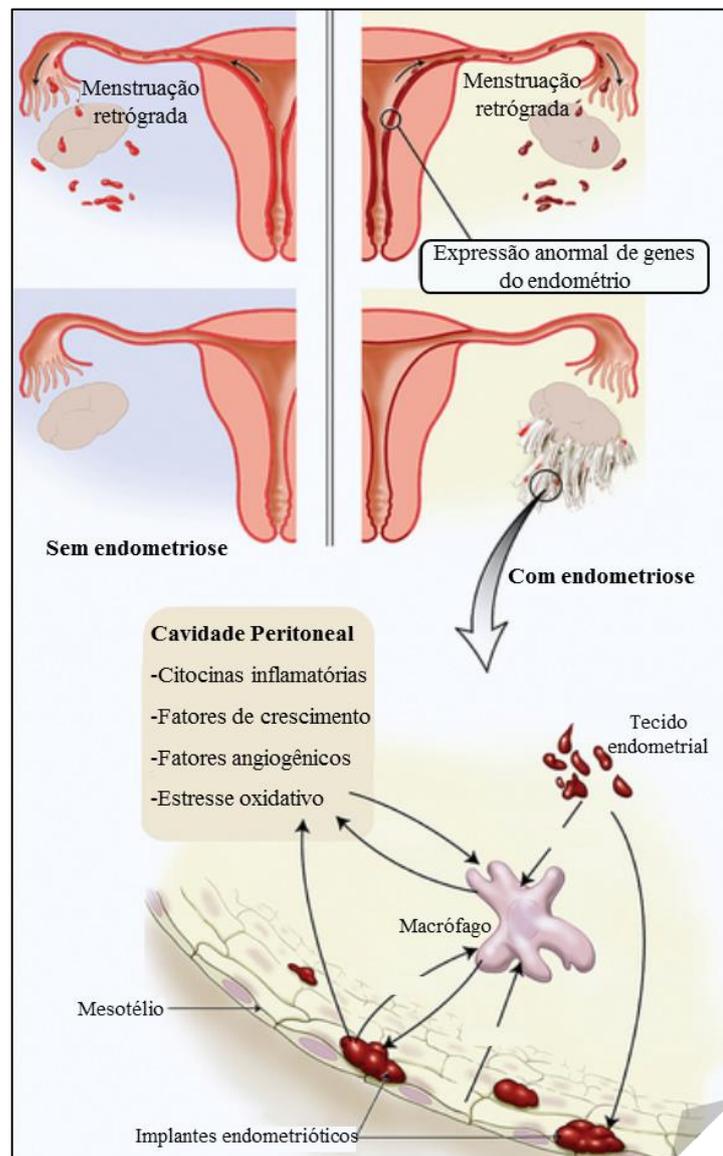
A endometriose é uma doença ginecológica inflamatória crônica, caracterizada pela presença de glândulas e estroma do tipo endometrial fora do útero (BURNEY e GIUDICE 2012; RICCIO et al., 2018). A fisiopatologia da endometriose e o mecanismo biológico da dor associada à doença permanecem controversos e pouco claros. Entretanto, sabe-se que fatores imunológicos, genéticos e hormonais estão envolvidos (ZHENG et al., 2018).

O surgimento da endometriose pode ser explicado, em parte, pela teoria da menstruação retrógrada proposta por Sampson (1927). Segundo esta teoria, a menstruação sofre refluxo pelas tubas uterinas, levando células endometriais que atingem o peritônio e órgãos nele localizados e conseguem se proliferar e aderir ao local (SAMPSON, 1927). A aderência das células ao peritônio e órgãos adjacentes se dá pela angiogênese, processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de um pré-existente, garantindo suporte às células e permitindo o desenvolvimento das lesões endometrióticas (TAYLOR et al., 2009).

Entretanto, a menstruação retrógrada ocorre em cerca de 90% das mulheres, enquanto apenas uma parte delas desenvolve a endometriose (REDWINE, 2002; BRICOU et al., 2008; FERRERO et al., 2015). Isso demonstra que a menstruação retrógrada por si só não explica o surgimento da endometriose e, portanto, outros mecanismos estão envolvidos etiologia da doença, como fatores genéticos e imunológicos (KOBAYASHI et al., 2013).

Segundo Kobayashi e colaboradores (2013), a endometriose pode ser estimulada pela má ativação de células inflamatórias (KOBAYASHI et al., 2013). Além disso, já foi demonstrado que mulheres com endometriose apresentam respostas imunológicas e inflamatórias alteradas, caracterizadas por níveis elevados de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17A) no peritônio e no endométrio ectópico (MALUTAN et al., 2015; ZHOU et al., 2019). Com isso, nestas mulheres, as células endometriais que sofrem fluxo retrógrado se deparam com um sistema imunológico defeituoso e que não consegue lidar com estas células recém-chegadas (MAIA JR et al., 2009). A figura 3 representa o fenômeno da menstruação retrógrada, seguido pela ação de diversos fatores nas células endometriais que atingem o peritônio de mulheres com endometriose.

Figura 3: Fenômeno da menstruação retrógrada e o desenvolvimento da endometriose.



Fonte: Adaptado de Falcone e Hurd (2007).

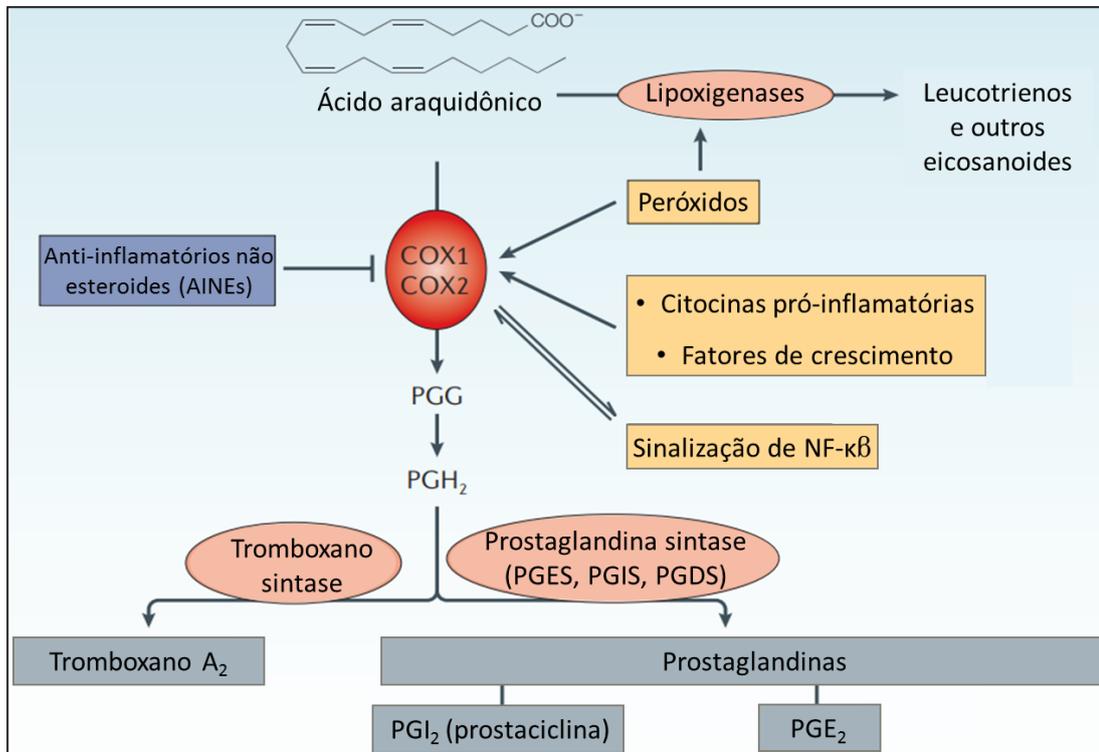
Outro importante fator a ser considerado na suscetibilidade à endometriose são as características hereditárias, já que a endometriose é uma doença que possui etiologia complexa, com envolvimento de fatores genéticos (BURNEY e GIUDICE, 2012). Um estudo realizado por Saha e colaboradores (2015) avaliou a contribuição relativa da genética no desenvolvimento da endometriose, através da análise de dados de endometriose auto relatada em irmãs-gêmeas dizigóticas e monozigóticas. Os autores observaram que a maior correlação entre pares foi encontrada entre gêmeas monozigóticas, indicando que a contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da endometriose foi de 47% (SAHA et al., 2015).

Com isso, o estudo da hereditariedade da endometriose tem avançado nos últimos anos (BURNEY e GIUDICE, 2012; KONINCKX et al., 2019; JOSEPH et al., 2019). Recentemente, Ahn e colaboradores (2016) avaliaram o perfil molecular de lesões endometrióticas de pacientes com a doença em estadiamento III/IV, em comparação ao endométrio eutópico de mulheres sem evidência da doença por uma análise de transcriptomas. Os autores demonstraram que 396 dos 579 genes relacionados à resposta imune e à inflamação rastreados foram significativamente diferentes nos tecidos ectópicos em comparação com o endométrio de controle (AHN et al., 2016).

## 2.7 PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA ENDOMETRIOSE

A endometriose é uma doença inflamatória e, portanto, regulada por diversos fatores envolvidos neste processo (ATTAR e BULUN, 2006; MAIA JR et al., 2012). Uma das principais vias inflamatórias é a do ácido araquidônico que culmina na produção de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e ácidos graxos. A enzima central dessa via é a prostaglandina endoperóxido sintase 2 (PTGS2), também conhecida como ciclooxigenase-2 (COX-2), que é responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos em resposta à inflamação (SMITH et al., 1996). As prostaglandinas modulam a resposta inflamatória principalmente através de sua influência na proliferação e migração celular, na apoptose e na angiogênese, que é um importante processo para o desenvolvimento da endometriose. As prostaciclina e tromboxanos atuam regulando a agregação plaquetária, a vasoconstrição e a proliferação vascular, seja inibindo (prostaciclina) ou induzindo (tromboxanos) (ULRICH et al., 2006). A figura 4 apresenta os principais componentes da via de conversão do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases (ULRICH et al., 2006).

Figura 4: Principais componentes da via de conversão do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases.



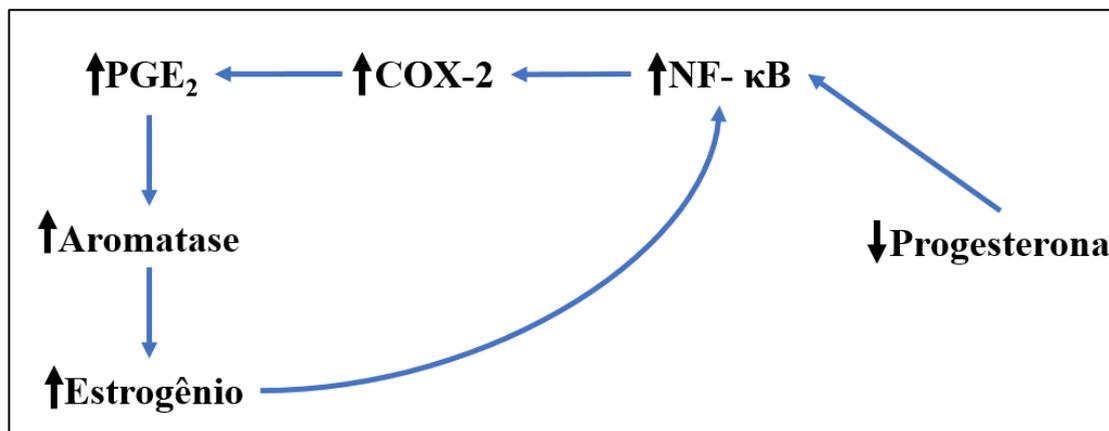
Fonte: Adaptado de Ulrich e cols. (2006)

Um passo essencial na progressão da endometriose é representado pela associação entre a inflamação e a ativação do gene da aromatase no endométrio, seguida pela produção local de estrogênio (ATTAR e BULUN, 2006). A Aromatase é codificada pelo gene *CYP19A1* (Citocromo P450 Família 19 Subfamília A Membro 1) (HARADA et al., 1990), que em condições fisiológicas normais, não é encontrada no endométrio, devido à inibição da transcrição gênica do *CYP19A1* (ATTAR e BULUN, 2006). Entretanto, mulheres com endometriose apresentam níveis elevados de prostaglandinas, principalmente PGE<sub>2</sub>, que ativa o promotor do gene *CYP19A1* e a síntese de Aromatase no endométrio, que por consequência, estimula a síntese de estrogênio (MAIA JR et al., 2009; MAIA JR et al., 2012).

Num cenário onde há níveis elevados de estrogênio, como é o caso da endometriose, há também redução nos receptores de progesterona, o que gera resistência a este hormônio e, conseqüentemente, aumento da ação proliferativa do estrogênio (IRUNGU et al., 2019). Com isso, um ciclo vicioso é gerado, pois o próprio estrogênio sintetizado estimula a produção de prostaglandinas através da ativação do fator nuclear-κB (NF-κB) e COX-2 (MODUGNO et al., 2005;

ATTAR e BULUN, 2006) (Figura 5). Sendo assim, esse processo é essencial para o estabelecimento da endometriose e será o responsável pela manutenção da sobrevivência das células endometriais ectópicas.

Figura 5: Regulação do microambiente inflamatório na endometriose.



Fonte: Adaptado de Maia Jr. e cols. (2012). No endométrio de mulheres com endometriose há ativação do gene da aromatase, seguida pela produção de estrogênio e consequente redução na sinalização da progesterona. Com isso, há ativação de NF-κB e aumento na expressão de COX-2 e na síntese de prostaglandinas (principalmente PGE<sub>2</sub>) que ativam o promotor de *CYP19A1*, criando um ciclo vicioso.

Já foi demonstrado que lesões endometrióticas possuem maior expressão de COX-2, em comparação ao endométrio eutópico (CHISHIMA et al., 2002; BUKULMEZ et al., 2008; CARRARELLI et al. 2016). Além disso, um estudo de caso-controle realizado por Matsuzaki et al. (2004) demonstrou que a expressão de COX-2 foi significativamente maior no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, em comparação ao de mulheres sem a doença (MATSUZAKI et al., 2004), o que indica que a expressão desta enzima pode estar envolvida no desenvolvimento da doença.

Como consequência da elevada expressão de COX-2 em mulheres com endometriose, também já foi demonstrado que mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, como a prostaglandina E2 (PGE2) e a F2α (PGF2α) também estão mais expressos no fluido peritoneal dessas pacientes (WU et al., 2010; SACCO et al., 2012). Estes mediadores são potentes ativadores nociceptores, ou seja, são responsáveis pela manifestação da dor (RAY et al., 2015; LAI et al., 2019), demonstrando que a elevada expressão de COX-2 pode estar relacionada não só com o surgimento da endometriose, mas também com o desenvolvimento de seus principais sintomas de dor.

Já se sabe que polimorfismos genéticos podem influenciar os níveis de expressão gênica e, consequentemente, de suas respectivas proteínas (GRIFFITHS et al., 2009). Dessa forma,

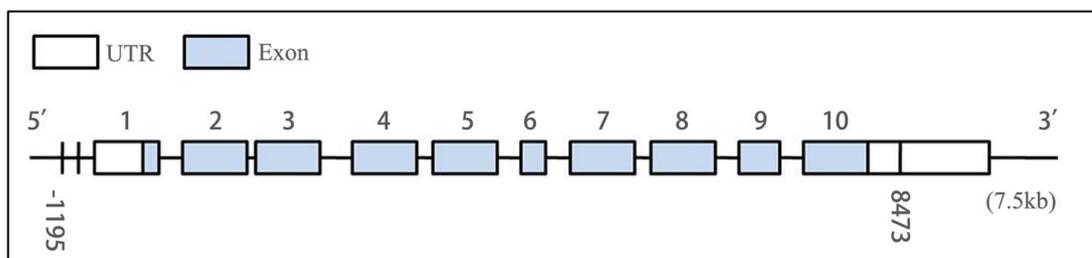
surge a hipótese de investigar a influência de polimorfismos funcionais do gene que codifica a COX-2 no desenvolvimento da endometriose.

## 2.8. GENE DA COX-2 E SEUS POLIMORFISMOS

A enzima Cox-2 é codificada pelo gene *PTGS2* e sua expressão varia entre indivíduos, o que pode ser atribuído à presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em regiões funcionais do gene (COK e MORRISON, 2001, PAPAFILI et al., 2002). O gene *PTGS2* é polimórfico, localizado no cromossomo 1, sendo formado por 10 éxons e 9 íntrons (APPLEBY et al., 1994). A região promotora do gene *PTGS2* possui um TATA box e sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como por exemplo o NF-kB (LAI et al., 2019). Diversos estudos investigam a influência de polimorfismos no *PTGS2* na expressão da COX-2 (ZHANG et al., 2005; MOORE et al., 2012; PIRANDA et al., 2017) e também a influência de polimorfismos deste gene no desenvolvimento da endometriose (JUO et al., 2009; KIM et al., 2012; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016).

Entre os polimorfismos conhecidos, destacam-se o SNP *PTGS2 -1195A>G* (rs689466) (ZHANG et al., 2005), presente na região promotora do gene, e o *PTGS +8473 T>C* (Figura 6), presente na região 3' não traduzida (3'UTR) (MOORE et al., 2012). O alelo *PTGS2 -1195A* cria um sítio de ligação c-MYB, que provoca uma atividade promotora cerca de 4-6 vezes maior em comparação ao alelo *PTGS2 -1195G* e, conseqüentemente, maior expressão de COX-2 (ZHANG et al., 2005). Já o alelo variante *PTGS2 +8473C*, aumenta a estabilidade do respectivo RNA mensageiro (RNAm), favorecendo a expressão do gene (MOORE et al., 2012).

Figura 6: Estrutura genômica do gene *PTGS2* e localização dos SNPs *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C*.



Fonte: Adaptado de Pan e cols. (2015). UTR = região não traduzida do gene (3' e 5'); kb = Kilobase, unidade de medida de pares de bases de nucleotídeos.

Ambos os SNPs possuem elevada frequência na população saudável, variando entre 11,7% e 68,5% para o alelo *PTGS2 -1195G* (PIRANDA et al., 2010; VOGEL et al., 2014; LIN

et al., 2015; ZHANG et al., 2015; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016; FURUYA et al., 2018; KUCHLER et al., 2019) e entre 16,3% e 39,8% para o alelo *PTGS2 +8473C* (PIRANDA et al., 2010; VOGEL et al., 2014; LIN et al., 2015; ZHANG et al., 2015; JIANG et al., 2017; FURUYA et al., 2018; KUCHLER et al., 2019). Além disso, as frequências são extremamente variáveis entre as populações, com as maiores observadas na população chinesa para o alelo -*1195G* (WANG et al., 2016) e na população brasileira para o *PTGS2 +8473C* (FURUYA et al., 2018). Na tabela 3 estão descritas as frequências dos genótipos e alelos variantes dos SNPs *PTGS2 -1195A>G* e *+8473T>C* na população saudável de diversas nacionalidades, publicadas nos últimos 10 anos.

Tabela 3: Frequência dos genótipos e alelos variantes dos SNPS PTGS2  $-1195A>G$  e  $+8473T>C$  na população saudável

SNP	População	N	% AA	% AG	% GG	%G	Referência
<b>-1195 A&gt;G</b>	Brasileira	245	77,0	21,0	2,0	11,7	PIRANDA et al., 2010
		262	61,1	35,4	3,5	21,2	FURUYA et al., 2018
		53	66,0	28,3	5,7	19,8	KUCHLER et al., 2019
	Chinesa	240	22,1	53,3	24,6	51,2	WANG et al., 2015
		29	10,3	41,4	48,3	69,0	WANG et al., 2016
		62	6,5	50,0	43,5	68,5	ZHANG et al., 2015
		199	25,5	46,0	28,5	52,0	LIN et al., 2015
	Taiwanesa	163	28,5	46,0	25,2	48,2	JUO et al., 2009
	Norueguesa	400	62,5	34,2	3,3	20,4	VOGEL et al., 2014
	SNP	População	N	% TT	% TC	% CC	%C
<b>+8473 T&gt;C</b>	Brasileira	244	49,0	41,0	10,0	30,5	PIRANDA et al., 2010
		262	41,7	37,1	21,2	39,8	FURUYA et al., 2018
		55	43,6	36,4	20,0	38,2	KUCHLER et al., 2019
	Chinesa	62	45,2	51,6	3,2	29,0	ZHANG et al., 2015
		199	54,5	38,5	7,0	26,0	LIN et al., 2015
		400	69,7	28,0	2,3	16,3	JIANG et al., 2017
	Norueguesa	400	9,8	47,8	42,4	33,7	VOGEL et al., 2014

Fonte: Própria

Três estudos já avaliaram a associação do SNP *PTGS2 -1195G>A* com o desenvolvimento da endometriose (JUO et al., 2009; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016), dos quais dois observaram aumento do risco da doença na presença do genótipo *-1195AA*, na população chinesa (WANG et al., 2015; WANG et al., 2016), enquanto que o terceiro não observou associação na população Taiwanesa (Tabela 4).

Até o momento, não existem estudos da associação do SNP *PTGS2 +8473 T>C* e o desenvolvimento da endometriose. Entretanto, este SNP já foi associado com o câncer de endométrio (TORRICELLI et al., 2015) e com o câncer de mama (PIRANDA et al., 2010; FESTA-VASCONCELLOS et al., 2012), doenças que possuem similaridades com a endometriose, como por exemplo o perfil inflamatório e responsividade ao estrogênio (ANIFANTAKI et al., 2016). Além disso, o *PTGS2 +8473 T>C* possui impacto na expressão da COX-2 (MOORE et al., 2012), o que também acrescenta à justificativa de estudá-lo na endometriose em mulheres brasileiras.

Tabela 4: Associações encontradas entre o SNP *PTGS2 -1195 A>G* e a endometriose em estudos já publicados.

População	N	AA (%)	AG (%)	GG (%)	<i>P-χ<sup>2</sup></i>	OR (IC 95%)	Referência
Chinesa	Casos (320)	33,4	50,3	16,3	0,001	2,29 (1,39 - 3,77) <sup>a</sup>	WANG et al., 2015
	Controles (240)	22,1	53,3	24,6			
	Casos (60)	31,7	40	28,3	<0,05	2,86 (1,25 - 7,44) <sup>b</sup>	WANG et al., 2016
	Controles (29)	10,3	41,4	48,3			
Taiwanesa	Casos (182)	32,4	43,4	24,2	0,28	0,68 (-) <sup>c</sup>	JUO et al., 2009
	Controles (163)	28,5	46	25,2			

Fonte: Própria; <sup>a</sup>OR e IC calculados entre indivíduos AA *versus* indivíduos GG, <sup>b</sup>OR e IC calculados entre indivíduos AA *versus* indivíduos AG ou GG; <sup>c</sup>IC não calculado.

Tendo em vista que estes SNPs ainda não foram estudados em mulheres brasileiras com endometriose, e que os estudos que já investigaram o SNP *PTGS2 -1195A>G* com a doença foram realizados em populações com distribuição genotípica distinta da que é encontrada no Brasil (Tabela 3), justifica-se a necessidade da validação da associação entre estes polimorfismos e a endometriose.

### 3. JUSTIFICATIVA

A endometriose é uma doença ginecológica crônica, com alta prevalência e que apresenta sintomas incapacitantes e que afetam negativamente a qualidade de vida das mulheres que a possuem. O diagnóstico definitivo da endometriose depende de métodos invasivos e pode levar anos até sua conclusão. Além disso, seu tratamento é ineficaz, uma vez que controla apenas os sintomas e não erradica as lesões endometrióticas, e o tratamento cirúrgico é oneroso, invasivo e com alta taxa de recorrência poucos anos após o procedimento.

Já se sabe que estímulos inflamatórios contribuem para o desenvolvimento e manutenção das lesões endometrióticas, bem como para a ocorrência dos sintomas incapacitantes da doença. Estudos prévios já demonstraram que alta expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), envolvida na produção de prostaglandinas e tromboxanos, é encontrada nas lesões de endometriose e no endométrio eutópico de mulheres com a doença. Estudos investigam se essa diferença na expressão do gene, pode ser explicada pela presença de polimorfismos no gene que codifica a COX-2 (*PTGS2*).

Sendo assim, há interesse na investigação de polimorfismos no gene *PTGS2*, a fim de buscar uma melhor compreensão da etiopatogenia da doença e contribuir para o desenvolvimento de um tratamento individualizado, baseado no perfil genético/inflamatório destas pacientes. Para isto, foi realizado um estudo caso-controle para investigar a magnitude de associação entre os SNPs *PTGS2* -1195G>A e +8473 T>C e o desenvolvimento da endometriose, bem como com as características prognósticas da doença.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a magnitude de associação entre os polimorfismos *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C* e o surgimento da endometriose, bem como sua associação com as características sociodemográficas e clínicas de mulheres brasileiras com endometriose e mulheres com diagnóstico negativo da doença.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *PTGS2 -1195A>G* e *+8473 T>C* em mulheres diagnosticadas com endometriose e em mulheres com diagnóstico negativo da doença;

Determinar a magnitude de associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento da endometriose;

Determinar a magnitude de associação entre os polimorfismos estudados e as características prognósticas da endometriose.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Caracterização de polimorfismos em genes envolvidos com a predisposição do desenvolvimento da endometriose”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE), em 25 de março de 2011 (Nº 000.414/2011) e do Hospital Moncorvo Filho (Número CAAE: 45941715.5.0000.5275), em 25 de setembro de 2015 (Anexos 1 e 2).

Todas as participantes do estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 3 e 4) antes de serem incluídas no estudo e obtiveram uma cópia deste. Todos os documentos gerados pelo presente estudo serão mantidos em armário com chave, com acesso restrito aos membros da equipe.

### 5.2. DESENHO E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo analítico do tipo caso controle, com pacientes recrutadas entre junho de 2010 e novembro de 2019. O grupo de casos foi composto por mulheres entre 18 a 60 anos de idade, com diagnóstico de endometriose realizado por videolaparoscopia/laparotomia e confirmação histopatológica, para as mulheres com lesões superficiais, ovarianas ou profundas/infiltrativas, ou por Ressonância Magnética, para mulheres com lesões profundas/infiltrativas. O grupo controle foi composto por mulheres com diagnóstico negativo da doença, submetidas a procedimentos cirúrgicos como laqueadura tubária, histerectomia ou retirada de miomas, cistos no ovário ou hidrossalpinge.

Foram excluídas do estudo mulheres que possuíam neoplasia maligna de qualquer natureza, adenomiose, que se recusaram a coletar o material biológico (sangue periférico) para posterior extração do DNA e as mulheres cujo diagnóstico de endometriose ainda não foi confirmado (N=81). Com isso, foram incluídas no estudo 521 mulheres, sendo 254 casos de endometriose e 267 controles negativos da doença.

Todas as mulheres convidadas a participar do presente estudo receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e foram orientadas a lê-lo cuidadosamente e a inquirir a respeito de qualquer dúvida quanto ao projeto.

### 5.3. COLETA DE DADOS

As entrevistas foram realizadas nos dias de consultas de rotina. Após uma breve explicação sobre o objetivo da pesquisa, as mulheres foram convidadas a participar, assinando o TCLE e, em seguida, respondendo ao questionário (Anexo 5). O questionário contendo

informações sociodemográficas, de hábitos de vida (consumo de álcool e tabaco), história reprodutiva, exposição a hormônios exógenos, hábitos alimentares, histórico familiar de endometriose e histórico familiar de câncer, foi aplicado por um entrevistador treinado e, após seu preenchimento, o entrevistador solicitava a coleta do sangue periférico.

#### 5.4. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foi realizada a coleta de sangue periférico (3 mL) das participantes para posterior extração do DNA e análise dos polimorfismos do gene selecionado. O sangue coletado foi encaminhado em recipiente adequado para transporte de material biológico para o laboratório de pesquisa do Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO) para extração do DNA genômico e posterior análise dos polimorfismos.

#### 5.5. EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

O sangue coletado foi utilizado para extração do DNA genômico utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico (Kit QIAamp DNA Mini – Qiagen), conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. Em resumo, serão adicionados 200µl de sangue, em um tubo eppendorf contendo uma solução tampão para lise das células. Em seguida, será centrifugado e descartado o sobrenadante. O processo de extração será realizado com etanol (96-100%), seguido da retenção do DNA em coluna específica (Kit QIAamp DNA Mini – Qiagen). O DNA será recuperado com tampão de lavagem e centrifugação. Para finalizar, será adicionado ao DNA extraído o tampão de eluição.

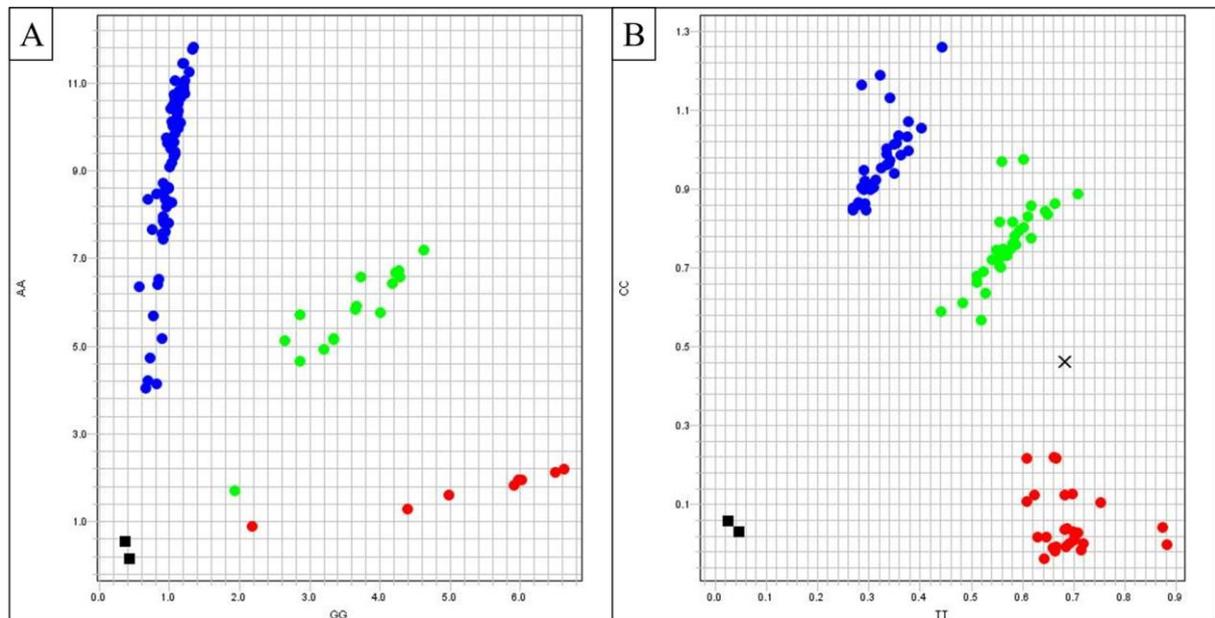
A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria utilizando o aparelho Nanodrop. As amostras de cada participante foram colocadas em tubos eppendorf de 1500 µl, devidamente etiquetados com o código interno do voluntário, a data de extração, e em seguida, foram armazenadas em freezer (-20°C) para posterior análise de genotipagem.

A análise dos polimorfismos dos genes em estudo foi realizada pela técnica de PCR em tempo real no laboratório de pesquisa da UEZO, que conta com os equipamentos necessários para a genotipagem proposta neste estudo.

Para todos os ensaios, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 8 µl, com 30 ng de DNA, 1x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1x de cada ensaio específico de oligo e sonda, e H<sub>2</sub>O q.s.p. As condições da PCR foram: 95°C por 10 minutos, acompanhados de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. A detecção dos alelos foi realizada após 1 minuto a 60°C no aparelho 7500 Real-Time System (Applied Biosystems), e, em seguida, os genótipos foram determinados

diretamente (Figura 7).

Figura 7: Exemplo da determinação dos genótipos de *PTGS2* -1195 A>G (A) e *PTGS2* +8473 T>C (B), por PCR em tempo real (Sistema Taqman).



Em azul (●), estão os indivíduos com genótipo homocigoto para o alelo 1 “VIC”; em verde (●), os heterocigotos e, em vermelho (●), os homocigotos para o alelo 2 “FAM”. Em preto (■), estão os controles negativos e o “x” indica as amostras que não amplificaram. Fonte: Thermo Fisher Scientific (2019).

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher, quando necessário.

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

As razões de chances (ORs) brutas e ajustadas foram estimadas pelo método de regressão logística não-condicional. Os modelos de regressão foram usados para determinar a influência de cada variável no desenvolvimento da endometriose. Foram consideradas como variáveis de confundimento as que apresentaram um p-valor de 0,10 na análise univariada, e as que apresentaram um p-valor de saída de 0,05 foram usadas para calcular as ORs ajustadas.

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

## 6. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação fizeram parte do artigo submetido à revista “Reproduction” (Fator de impacto: 3.125) no dia 18 de março de 2020 (Anexo 6), sob o título “*PTGS2 -1195A>G polymorphism was associated with lower risk of endometriosis*”, conforme abaixo:

Em resumo, este estudo foi capaz de demonstrar que, na população estudada, as mulheres com endometriose são estatisticamente mais jovens ( $P < 0,001$ ; OR = 0,47; 95% IC = 0,32 – 0,68), possuem menor IMC ( $P = 0,001$ ) e maior nível educacional ( $P < 0,001$ ), praticam mais atividade física ( $P = 0,003$ ; OR = 1,73; 95% IC = 1,20 – 2,48) e possuem menos hábito de fumar ( $P < 0,001$ ; OR = 0,46; 95% IC = 0,31 – 0,70) em relação às controles. Além disso, o uso de contraceptivos ( $P = 0,01$ ; OR = 2.18; 95% IC = 1,20 – 3,97) e o histórico de endometriose em familiares de primeiro grau ( $P = 0,001$ ; OR = 2.29; 95% IC = 1,36 – 3,85) também foi estatisticamente maior no grupo de casos. Assim como já descrito na literatura, os sintomas característicos de endometriose foram significativamente mais frequentes no grupo de casos ( $P < 0,001$ ), apesar do grupo controles possuir doenças ginecológicas benignas que também possam provocar sintomas similares.

Em relação aos polimorfismos *PTGS2 -1195 A>G* e *+8473 T>C*, foi observada apenas associação entre as mulheres portadoras do genótipo *PTGS2 -1195GG* e um menor risco de desenvolver a endometriose ( $P = 0,04$ ; OR = 0.19; 95% IC = 0,04 – 0,93). Não houve diferenças significativas em relação aos SNPs do *PTGS2* e às características prognósticas da doença. Como conclusão, o SNP *PTGS2-1195 A>G* parece afetar o desenvolvimento da endometriose, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da doença e possivelmente auxiliar na orientação do tratamento individualizado das mulheres com endometriose.



## PTGS2 -1195A>G polymorphism was associated with lower risk of endometriosis

Journal:	<i>Reproduction</i>
Manuscript ID	Draft
mstype:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>da Silva, Mayara; Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Pharmacy; Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente</p> <p>Machado, Daniel; Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Pharmacy</p> <p>Cardoso, Jéssica; Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Pharmacy; Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente</p> <p>Freitas-Alves, Daniely ; Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas</p> <p>Costa, Isabelle; Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Pharmacy</p> <p>Berardo, Plínio; Hospital Federal dos Servidores , Serviço de Ginecologia; Universidade Estácio de Sá, Faculdade de Medicina</p> <p>Ferrari, Renato; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Hospital Moncorvo Filho</p> <p>Sabrao, Mauricio; Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina; Beneficência Portuguesa de São Paulo, Divisão de Ginecologia</p> <p>Vianna-Jorge, Rosane; Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas</p> <p>Perini, Jamila Alessandra; Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Pharmacy; Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente</p>
Keywords:	Endometriosis, PTGS2, COX-2, Polymorphisms

***PTGS2 -1195A>G polymorphism was associated with lower risk of endometriosis.***

Mayara Calixto da Silva<sup>1,2</sup>, Daniel Escorsim Machado<sup>1</sup>, Jéssica Vilarinho Cardoso<sup>1,2</sup>, Daniely Regina Freitas-Alves<sup>2,3</sup>, Isabelle Alves Costa<sup>1</sup>, Plínio Tostes Berardo<sup>4,5</sup>, Renato Ferrari<sup>6</sup>, Maurício Simões Abrão<sup>7,8</sup>, Rosane Vianna-Jorge<sup>2,3</sup>, Jamila Alessandra Perini<sup>1,2</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>4</sup>Serviço de Ginecologia, Hospital Federal dos Servidores do Estado, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>5</sup>Departamento de Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>6</sup>Instituto de Ginecologia, Hospital Moncorvo Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

<sup>7</sup>Seção de Endometriose, Divisão de Ginecologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

<sup>8</sup>Divisão de Ginecologia, Beneficência Portuguesa de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

**Corresponding Author:** Jamila Alessandra Perini, 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. Fax: +55 21 2332 753. E-mail address: [jamilaperini@yahoo.com.br](mailto:jamilaperini@yahoo.com.br) / [jamila.perini@pq.cnpq.br](mailto:jamila.perini@pq.cnpq.br)

**Short title:** *PTGS2* polymorphisms in endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis, *PTGS2*, COX-2, Polymorphisms.

**Word count:** 2.895 words

## ABSTRACT

Endometriosis is an inflammatory gynecological disease and the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, encoded by the prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (*PTGS2*) gene, is overexpressed in endometriotic lesions. This study aimed to evaluate the potential role of the *PTGS2* single nucleotide polymorphisms (SNPs) *-1195 A>G* and *+8473 T>C* in endometriosis' development; and characterizing their association with the prognostic features of the disease. DNA from 254 women with endometriosis and 267 controls, recruited from two reference hospitals from the Brazilian public health system, were genotyped using TaqMan allelic discrimination assays. The association between SNPs and endometriosis features was evaluated by multivariate logistic regression, using the adjusted odds ratios (OR) with their respective 95% confidence intervals (95% CI). There were significant differences between cases and controls regarding age ( $P < 0.001$ ), body mass index (BMI) ( $P = 0.001$ ), educational level ( $P < 0.001$ ), physical activity ( $P = 0.003$ ), smoking status ( $P < 0.001$ ), contraception use ( $P = 0.002$ ) and all symptoms ( $P < 0.001$ ). The distribution of *-1195 A>G* was statistically different between the groups, suggesting a lower risk of developing the disease for the carriers of the *-1195GG* genotype (OR = 0.19; 95% CI = 0.04 – 0.93). No differences were found for the *+8473 T>C* between the two groups and neither in prognostic features of the disease for both *PTGS2* SNPs. In conclusion, *PTGS2 -1195A>G* SNP was negatively associated with development of endometriosis and the two groups were statistically different regarding age, BMI, educational level, physical activity, smoking status, contraception use, history of endometriosis and all endometriosis symptoms.

## INTRODUCTION

Endometriosis is a chronic inflammatory gynecological disease (Riccio *et al.* 2018) that affects approximately 10% of women in reproductive age (Eisenberg *et al.* 2018), and is characterized by estrogen-responsive endometrial tissue outside the uterine cavity, which affect mainly ovaries, peritoneum, recto-vaginal and recto-sigmoid regions, bladder and intestine (Burney & Giudice 2012). Symptoms include mostly pain, which may present as dysmenorrhea, chronic pelvic pain, dyspareunia and cyclic intestinal or urinary pain, plus infertility. Although patients present these complaints with different frequencies and intensities (Zondervan *et al.* 2018), they usually describe them as incapacitating and significantly compromising their quality of life (Nnoaham *et al.* 2011).

The first-line therapy for endometriosis-related pain include nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Ray *et al.* 2015; Ferrero *et al.* 2018) aiming to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes and prevent the enzymatic oxidation of arachidonic acid to generate prostanoids. COX-2 and the derived lipid-mediators from arachidonic acid, such as prostaglandin E2 (PGE2) and F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) are potent activators of nociceptors and, hence, have the ability to manage pain (Rai *et al.* 2015; Lai *et al.* 2019).

The pathogenesis of endometriosis is not fully understood yet, however, it is known that local inflammatory stimuli contribute to the maintenance and growth of ectopic lesions (Kobayashi *et al.* 2014), as well as to the manifestation of pain symptoms (Morotti *et al.* 2017). COX-2 was increased in endometriotic lesions as compared to the eutopic endometrium of women with endometriosis (Chishima *et al.* 2002; Bukulmez *et al.* 2008; Carrarelli *et al.* 2016) and as compared with eutopic endometrium of women without the disease (Matsuzaki *et al.* 2004). Moreover, Carrarelli and colleagues demonstrated that expression of COX-2 was higher in deep infiltrative endometriosis (DIE) than in ovarian endometrioma (OMA), suggesting that this enzyme may be involved in the progression of endometriosis (Carrarelli *et al.* 2016).

COX-2 is encoded by the prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (*PTGS2*) gene

(Tanabe & Tohnai 2002), which is a polymorphic gene. From the single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in this gene, the *-1195 A>G* and the *8473 T>C* stands out for their elevated frequency in the Brazilian population (11.7% to 21.2% and 30.5% to 38.2%, respectively) and their possible biological action (Piranda *et al.* 2010; Cavalcanti *et al.*, 2016;). The *-1195 A>G* SNP is located in the promoter region of the *PTGS2* gene and the *PTGS2 -1195 A* allele creates a MYB-binding site, which might lead to increased transcriptional activity of the gene (Zhang *et al.* 2005). The *PTGS2 +8473 T>C* SNP is located in the 3'UTR and increases stability of *PTGS2* mRNA, favoring gene expression (Moore *et al.* 2012). A case-control study conducted in the Brazilian population with *PTGS2 -765G>C* SNP demonstrated a lower risk of developing stage III/IV endometriosis for women carrying the *-765C* allele. Regarding the *PTGS2 -1195 A>G* and *+8473 T>C* SNPs, no studies were conducted in Brazilian women with endometriosis. However, in the Chinese population, it was observed a higher risk of developing endometriosis in the presence of the *PTGS2 -1195 A* allele [Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016].

Therefore, the current study was designed to investigate the association between the *PTGS2* SNPs *-1195 A>G* and *+8473 T>C* and the development of endometriosis, as well as their influence on the prognostic features of the disease.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Study design*

The current study comprises a retrospective case-control evaluation of 521 women recruited from two reference centers in Brazil, between 2010 and 2019: *Hospital Federal dos Servidores do Estado* (protocol 414/2011) and *Hospital Moncorvo Filho* (protocol 1.244.294/2015). The study protocol was approved by the Human Research Ethics Committees of both hospitals, and all patients provided written consent to take part. All sociodemographic and clinical data obtained during the recruitment process between July, 2010 and November,

2019.

Data were collected from 254 women undergoing laparoscopy or magnetic resonance imaging (MRI) for endometriosis and 267 controls with no visible ectopic endometrium sites who underwent surgery for tubal ligation or treatment of benign diseases such as ovarian fibroids and cysts. All endometriosis cases were classified in superficial endometriosis (SUP; N = 18), or ovarian endometrioma (OMA; N = 58) or deep infiltrative endometriosis (DIE; N = 178); and cases diagnosed by surgery were divided into two groups (stages I and II - N = 73, and stages III and IV - N = 77). All infiltrative lesions associated with SUP and OMA was considered DIE (Chapron et al. 2012). The exclusion criteria were diagnosis of adenomyosis, any previous or current history of cancer or rheumatoid arthritis.

#### *Polymorphisms genotyping*

Peripheral blood samples (5 mL) were collected for subsequent extraction of genomic DNA as previously described (Cardoso et al. 2017a; Cardoso et al. 2017b; Cardoso et al. 2019). Patients were genotyped for *-1195A>G* (rs689466) and *8473T>C* (rs5275) using Real-Time PCR (TaqMan®). Specific oligonucleotides and probes to each SNP were obtained from Applied Biosystems: rs689466 (C\_2517145\_20) and rs5275 (C\_7550203\_10). PCR conditions were those recommended by the manufacturer: 40 cycles at 95°C denaturation (10 s), 60°C (30 s), and 65°C annealing/extension (95 min). Allele-detection was performed on a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), to determine the allelic discrimination.

#### *Statistical analysis*

A descriptive study of the population was conducted, presenting relative frequencies for each categorical variable. The categorical data were expressed as percentages, and evaluated by the Chi-square ( $\chi^2$ ) test or Fisher's exact test, when applicable. Values of  $P < 0.05$  were

considered statistically significant. Genotypic frequencies of *PTGS2* SNPs were derived by direct gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the Chi-square test for goodness-of-fit. The distribution of *PTGS2* genotypes, alleles and combined genotypes according prognostic features were also evaluated using the Chi-square or Fisher's exact tests.

The magnitude of association from each comparison was estimated by calculation of crude odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs). Sociodemographic and clinical features that presented P-value input of 0.10 in the univariate analysis were included as covariates in multivariate logistic regression models to adjust of possible confounding factors, and the P-value output of 0.05 was considered as statistically significant. All statistical analyses were conducted using the SPSS 20.0 software (SPSS Incorporationto Chicago, IL, USA).

## **RESULTS**

Table 1 presents the main sociodemographic characteristics of the study population (N = 521). The endometriosis case group was statistically younger and had lower BMI than the control group, showing a protection for developing endometriosis. The educational level was also statistically different between the groups and women with graduate education had a higher endometriosis risk. It was observed that women with endometriosis exercised more than those in the control group and were less likely to smoke, demonstrating physical activity as a risk factor and the smoking status as a protection factor for developing endometriosis. In addition, women with endometriosis were more likely to use hormonal contraceptives and to have history of endometriosis among first-degree relatives.

Table 1: Sociodemographic characteristics of the study population (N = 521)

Variables	Controls (N=267)	Cases (N=254)			Variables	Controls (N=267)	Cases (N=254)		
<b>Age</b>	N (%)		<i>P</i> - $\chi^2$	OR	<b>Physical activity</b>	N (%)		<i>P</i> - $\chi^2$	OR
≤ 35	68 (25.9)	104 (42.6)	<0.001	1	No	137 (58.1)	109 (44.5)	0.003	1
> 35	195 (74.1)	140 (57.4)		0.47 (0.32 - 0.68)	Yes <sup>a</sup>	99 (41.9)	136 (55.5)		1.73 (1.20 - 2.48)
Missing	4	10			Missing	31	9		
<b>BMI</b>					<b>Smoking status</b>				
< 25	77 (30.3)	107 (43.0)	0.001	1	No	179 (68.1)	207 (82.1)	<0.001	1
25 – 29.9	70 (27.6)	76 (30.5)		0.78 (0.51 - 1.21)	Yes <sup>b</sup>	84 (31.9)	45 (17.9)		0.46 (0.31 - 0.70)
30 - 40	95 (37.4)	62 (24.9)		0.47 (0.30 - 0.73)	Missing	4	2		
> 40	12 (4.7)	4 (1.6)		0.24 (0.08 - 0.77)					
Missing	13	5							
<b>Marital status</b>					<b>Alcohol consumption</b>				
Married	107 (60.1)	148 (61.2)	0.84	1	No	84 (34.7)	103 (42.4)	0.08	1
Single	71 (39.9)	94 (38.8)		0.96 (0.64 - 1.42)	Yes <sup>c</sup>	158 (65.3)	140 (57.6)		0.72 (0.50 - 1.04)
Missing	89	12			Missing	25	11		
<b>Educational level</b>					<b>Contraception use<sup>d</sup></b>				
High school	101 (56.7)	117 (48.5)	<0.001	1	No	30 (15.9)	20 (8.0)	0.01	1
Primary school	56(31.5)	38 (15.8)		0.59 (0.36 -0.96)	Yes	159 (84.1)	231 (92.0)		2.18 (1.20 - 3.97)
Graduate education	21 (11.8)	86 (35.7)		3.54 (2.05 - 6.11)	Missing	78	3		
Missing	89	13							
					<b>History of endometriosis<sup>e</sup></b>				
					No	221 (89.8)	189 (79.4)	0.001	1
					Yes	25 (10.2)	49 (20.6)		2.29 (1.36 - 3.85)
					Missing	21	16		

*P*- $\chi^2$  from Chi-square test (Pearson *P*-value). OR = odds ratio; BMI = Body mass index. <sup>a</sup>Past and present physical activity; <sup>b</sup>Past and present smoker; <sup>c</sup>Past and present consumption; <sup>d</sup> oral or injectable contraceptive use; <sup>e</sup>Family history only in first-degree relatives.

Table 2 describes the reproductive characteristics and the most relevant endometriosis symptoms of the study population. There were no significant differences of variables age at menarche, menstrual cycle, menstrual flow and menopause between cases and controls. However, all endometriosis symptoms (dysmenorrhea, non-cyclic chronic pelvic pain, deep dyspareunia, cyclical intestinal and urinary complaints and infertility) were significantly more frequent in endometriosis cases than in controls.

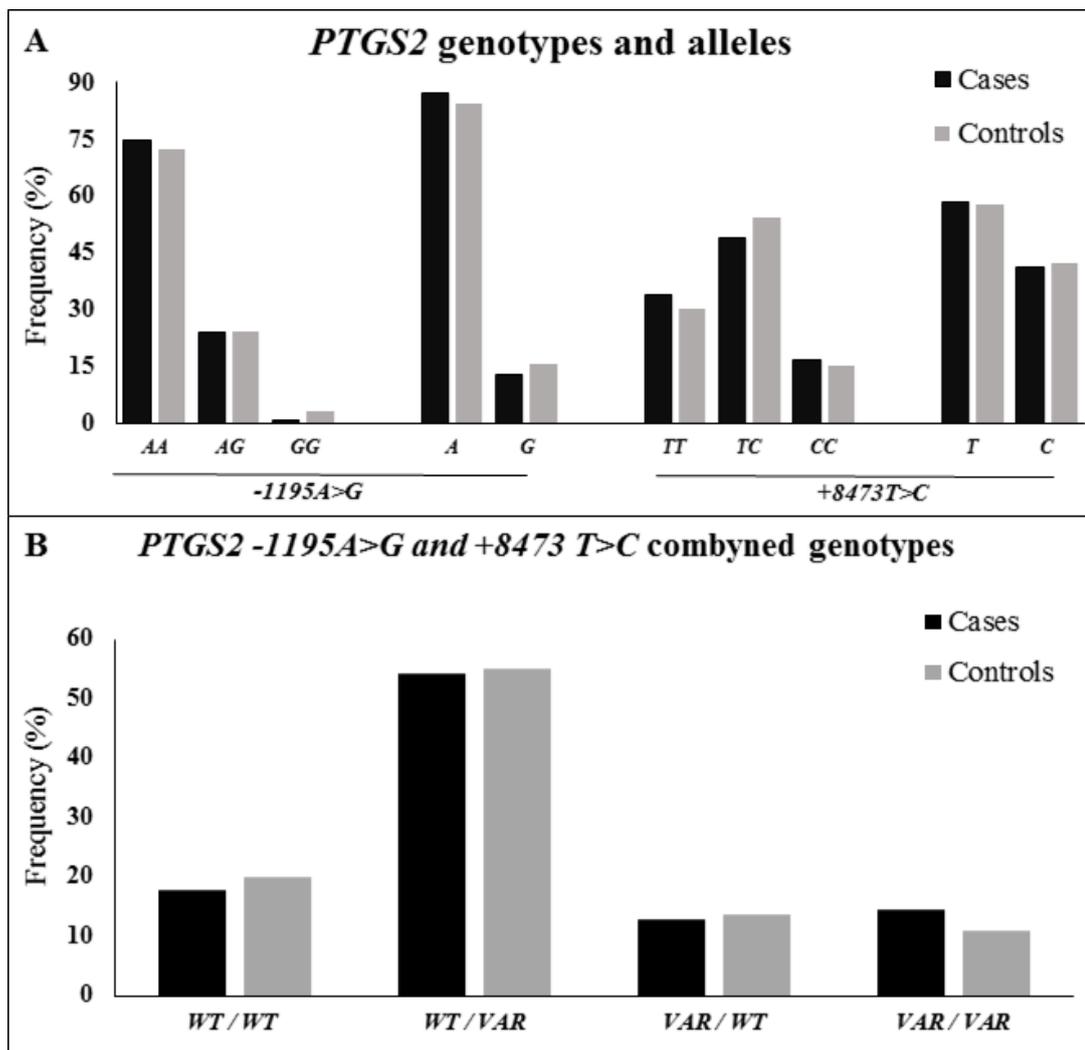
Table 2: Clinic characteristics of the study population (N = 521)

Variables	Controls (N=267)	Cases (N=254)			Variables	Controls (N=267)	Cases (N=254)		
<b>Age at menarche</b>	N (%)		<i>P-χ<sup>2</sup></i>	<b>OR</b>	<b>Dysmenorrhea<sup>a</sup></b>	N (%)		<i>P-χ<sup>2</sup></i>	<b>OR</b>
≤ 12	131 (53.0)	123 (49.8)	0.47	1	No	159 (61.4)	48 (19.0)	<0.001	1
> 12	116 (47.0)	124 (50.2)		1.14 (0.80 - 1.62)	Yes	100 (38.6)	205 (81.0)		6.79 (4.54 - 10.15)
Missing	20	7			Missing	8	1		
<b>Menstrual cycle</b>					<b>Non-cyclic chronic pelvic pain<sup>a</sup></b>				
Regular	122 (46.9)	127 (50.6)	0.41	1	No	211 (81.8)	122 (48.2)	<0.001	1
Irregular	138 (53.1)	124 (49.4)		0.86 (0.61 - 1.22)	Yes	47 (18.2)	131 (51.8)		4.82 (3.23 - 7.20)
Missing	7	3			Missing	9	1		
<b>Menstrual flow</b>					<b>Deep dyspareunia<sup>a</sup></b>				
Normal	74 (31.6)	75 (30.5)	0.81	1	No	204 (78.2)	85 (34.4)	<0.001	1
Decreased	15 (6.4)	18 (7.3)		1.18 (0.56 - 2.52)	Yes	57 (21.8)	162 (65.6)		6.82 (4.60 - 10.11)
Increased	145 (62.0)	153 (62.2)		1.04 (0.70 - 1.54)	Missing	6	7		
Missing	33	8							
<b>Menopause</b>					<b>Cyclical Intestinal Complaints<sup>a,b</sup></b>				
No	181 (96.8)	239 (96.8)	0.9	1	No	208 (90.0)	121 (49.4)	<0.001	1
Yes	6 (3.2)	8 (3.2)		1.01 (0.34 - 2.96)	Yes	23 (10.0)	124 (50.6)		9.27 (5.63 - 15.25)
Missing	80	7			Missing	36	9		
<b>Infertility<sup>a,c</sup></b>					<b>Cyclical Urinary Complaints<sup>a,b</sup></b>				
No	201 (86.3)	101 (50.8)	<0.001	1	No	221 (95.7)	186 (75.9)	<0.001	1
Yes	32 (13.7)	98 (49.2)		6.09 (3.83 - 9.71)	Yes	10 (4.3)	59 (24.1)		7.01 (3.49 - 14.09)
Missing	34 <sup>e</sup>	55 <sup>d</sup>			Missing	36	9		

*P-χ<sup>2</sup>* from Chi-square test (Pearson *P*-value); OR = odds ratio. <sup>a</sup>A patient can have more than one concomitant symptom; <sup>b</sup>Pain and bleeding; <sup>c</sup>Primary or secondary; <sup>d</sup>54 patients did not attempt to conceive; <sup>e</sup>28 patients did not attempt to conceive.

The rate of successful genotyping for the *PTGS2* SNPs  $-1195 A>G$  and  $+8473 T>C$  was 97.9% and 98.1%, respectively and all genotypic distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of *PTGS2* genotypes, alleles and combined genotypes of *PTGS2* SNPs  $-1195 A>G$  and  $+8473 T>C$  between cases and controls is shown in Figure 1.

Figure 1: Distribution of *PTGS2* genotypes, alleles (A) and combined genotypes (B) between cases and controls (N = 521)



WT/WT = AA/TT; WT/VAR = AA/TC or AA/CC; VAR/WT = AG/TT or GG/TT; VAR/VAR = AG/TC or AG/CC or GG/TC or GG/CC

A statistically different frequency was observed between cases and controls with the *PTGS2* -1195 *GG* genotype, in comparison to the *PTGS2* -1195 *AA* genotype ( $P = 0.04$ ). After adjustment for confounding factors (age, BMI, educational level, physical activity, smoking status, alcohol consumption, contraception use and history of endometriosis), *PTGS2* -1195 *GG* genotype was associated with lower risk of developing the endometriosis. No significant associations were found in *PTGS2* +8473 *T>C* SNP with endometriosis, either considering all cases, DIE or stages III-IV endometriosis (Table 3).

Table 3: Association between the *PTGS2* SNPs and endometriosis and its prognostic features (N = 521)

<i>PTGS2</i> SNP	Controls (N=259)	All Cases (N=251)	OR <sup>a</sup> (95%CI)	DIE Cases (N=176)	OR <sup>a</sup> (95%CI)	III/IV Cases <sup>c</sup> (N=76)	OR <sup>a</sup> (95%CI)
<b>-1195 A&gt;G</b>							
<i>AA</i>	187 (72.2)	188 (74.9)	1 <sup>b</sup>	135 (76.7)	1 <sup>b</sup>	55 (72.4)	1 <sup>b</sup>
<i>AG</i>	63 (24.3)	61 (24.3)	1.01 (0.60 - 1.69)	41 (23.3)	0.92 (0.52 - 1.63)	21 (27.6)	1.21 (0.58 - 2.51)
<i>GG</i>	9 (3.5)	2 (0.8)	0.19 (0.04 - 0.93)	0 (0.0)	-	0 (0.0)	-
<i>AA</i>	187 (72.2)	188 (74.9)	1 <sup>b</sup>	135 (76.7)	1 <sup>b</sup>	55 (72.4)	1 <sup>b</sup>
<i>AG+GG</i>	72 (27.8)	63 (25.1)	0.84 (0.50 - 1.39)	41 (23.3)	0.66 (0.37 - 1.17)	21 (27.6)	1.07 (0.52 - 2.20)
<i>AA+AG</i>	250 (96.5)	249 (99.2)	1 <sup>b</sup>	176 (100)	1 <sup>b</sup>	76 (100)	1 <sup>b</sup>
<i>GG</i>	9 (3.5)	2 (0.8)	0.22 (0.04 - 1.22)	0 (0.0)	-	0 (0.0)	-
<b>+8473 T&gt;C</b>							
	Controls (N=262)	All Cases (N=249)	OR <sup>a</sup> (95%CI)	DIE Cases (N=174)	OR <sup>a</sup> (95%CI)	III/IV Cases <sup>b</sup> (N=74)	OR <sup>a</sup> (95%CI)
<i>TT</i>	80 (30.5)	85 (34.1)	1 <sup>b</sup>	58 (33.3)	1 <sup>b</sup>	23 (31.1)	1 <sup>b</sup>
<i>TC</i>	142 (54.2)	122 (49.0)	0.64 (0.38 - 1.08)	85 (48.9)	0.69 (0.38 - 1.25)	40 (54.1)	0.75 (0.35 - 1.63)
<i>CC</i>	40 (15.3)	42 (16.9)	0.87 (0.45 - 1.69)	31 (17.8)	0.95 (0.45 - 1.98)	11 (14.8)	0.91 (0.31 - 2.66)
<i>TT</i>	80 (30.5)	85 (34.1)	1 <sup>b</sup>	58 (33.3)	1 <sup>b</sup>	23 (31.1)	1 <sup>b</sup>
<i>TC+CC</i>	182 (69.5)	164 (65.9)	0.68 (0.42 - 1.10)	116 (66.7)	0.72 (0.42 - 1.24)	51 (68.9)	0.75 (0.37 - 1.53)
<i>TT+TC</i>	222 (84.7)	207 (83.1)	1 <sup>b</sup>	143 (82.2)	1 <sup>b</sup>	63 (85.2)	1 <sup>b</sup>
<i>CC</i>	40 (15.3)	42 (16.9)	1.19 (0.63 - 2.25)	31 (17.8)	1.24 (0.65 - 2.36)	11 (14.8)	1.16 (0.47 - 2.86)

OR<sub>a</sub> = odds ratio adjusted; CI = confidence interval; DIE = deep infiltrative endometriosis; <sup>a</sup>Variables that presented P-value of 0.10 on Tables 1 and 2 were included in this analysis and variables with a P-value of 0.05 remained in the model; <sup>b</sup>Reference genotype; <sup>c</sup>Staging refers only to patients diagnosed by surgery.

## DISCUSSION

The present work was designed to evaluate the potential role of *PTGS2* SNPs *-1195A>G* and *+8473T>C* in development of endometriosis and characterizing their association with the prognostic features of the disease. Three studies evaluated (Juo *et al.* 2009, Wang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2016) *PTGS2 -1195A>G* SNP in endometriosis development, of which only two found a significant association with the disease (Wang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2016). Wang and cols. (2015) and Wang and cols. (2016), reported a higher frequency of the *PTGS2 -1195AA* genotype in endometriosis patients, suggesting a 2-fold increased risk for the development of endometriosis (Wang *et al.* 2015, Wang *et al.* 2016). In the present study, it was found a higher frequency of the *PTGS2 -1195AA* genotype in the endometriosis group (74.9%) in comparison to the control group (72.2%). The *PTGS2 -1195A* allele is responsible for an increased transcriptional activity due to allowing the transcription factor c-Myb to bind with the promoter region of the *PTGS2* gene (Zhang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2016). Despite the presence of the *PTGS2 +8473T* allele to create a binding site to miR542-3p, promoting the degradation of the messenger RNA and decreasing gene expression (Moore *et al.* 2012), no significant association was observed between *PTGS2 +8473T>C* SNP and development of endometriosis neither their features. As far as we know, there are no studies on the association of the *PTGS2 +8473 T>C* SNP and the development of endometriosis.

Endometriosis is a heterogeneous disease that can be influenced by genetic, hormonal, immunological and environmental factors (Deiana *et al.*, 2019). Family studies stand out for their capacity to show that gene susceptibility plays a key role in disease development. A study carried out in 2015 evaluated the relative contribution of genetics in the development of endometriosis, through the analysis of self-reported endometriosis data in dizygotic and monozygous twin sisters. The authors observed that the greatest correlation between pairs was found among monozygotic twins, indicating that the contribution of genetic factors to the development of endometriosis was 47% (Saha *et al.* 2015). In our studied population, most

women with family history of endometriosis belonged to the group of cases, which corroborates with previous studies (Hansen & Eyster 2010, Audebert *et al.* 2015, Reis *et al.* 2019).

A lower risk of developing endometriosis was observed among women over 35 years old. A review study carried out in 2018 demonstrated that the peak incidence of endometriosis in women of different nationalities occurs between 25 and 34 years old, corroborating with our findings (Shafrir *et al.* 2018). These results endorse the fact that endometriosis affects women in reproductive age, which is directly related with high levels of circulating estrogen during this period (Prince *et al.* 2018). In addition, nowadays the tendency for women is to use contraceptives at earlier ages and, hence, for longer periods. Therefore, it's common that most of them discover the endometriosis only when they decide to get pregnant (Hruska *et al.* 2000, Hemmings *et al.* 2004), which usually happens after achieving higher levels of education (Kallner & Danielsson, 2016).

Despite the association between endometriosis and BMI is not well established yet (Eisenberg *et al.* 2018), our findings agree with previous studies that described an inverse association between endometriosis and BMI (Perini *et al.* 2014, Chapron *et al.* 2016, Backonja *et al.* 2017, Reis *et al.* 2019). Accordingly, a recent study demonstrated that endometriosis alters the expression of genes involved in driving brown adipocyte differentiation, appetite, insulin sensitivity and fat metabolism, such as leptin, adiponectin and *IL-6*, via the circulating microRNAs that known to be altered in endometriosis (Let-7b and miR-342). This altered expression leads to fat cells with altered lipid and glucose metabolism and propensity toward lower fat mass, which can be an explanation to the lower BMI observed in women with endometriosis (Zolbin *et al.* 2019).

Some studies have assessed the association between physical activity and risk of endometriosis, finding results similar to ours (Farland *et al.* 2017), meanwhile, this relation is still unclear (Bonoche *et al.* 2014, Shafrir *et al.* 2018). Biologically, estrogen levels tend to decrease with physical activity, and to increase levels of sex hormone binding globulin (SHBG),

thereby reducing even more bioavailable estrogens (Ricci *et al.* 2016). However, a few studies state that this practice helps relieving endometriosis related pain symptoms (Koppan *et al.* 2010, Awad *et al.* 2017), which may explain why, in this particular population sample, women with endometriosis were more likely to practice some physical activity. Thereby, it is not possible to affirm whether these women started exercising to relieve pain or if they already had this habit before the diagnosis of endometriosis.

The available studies regarding the association between endometriosis and smoking showed some controversial results. Despite some studies showed a negative association between smoking and endometriosis (Chapron *et al.* 2016, Backonja *et al.* 2017, Reis *et al.* 2019), corroborating with our findings, other studies found evidence that smoking is a risk factor for endometriosis (Evans & Decherney 2017) or that there is no association at all (Bravi *et al.* 2014, Hemmert *et al.* 2019). It is known that smoke impairs oestradiol and progesterone synthesis, decreasing circulating estrogens in women who smoke and inhibiting the growth and persistence of endometriotic tissue. However, it also affects the expression of pro-inflammatory gene in both pulmonary and extrapulmonary environments, promoting inflammation associated events such as endometriosis occurrence (Parazzini *et al.* 2016, Parasar *et al.* 2017).

In the present study, it was observed a high prevalence of dysmenorrhea, chronic pelvic pain, dyspareunia, cyclical intestinal or urinary complaints and infertility in patients with endometriosis, when compared to controls. The main symptoms of endometriosis are well established and involve pain, being common reason for the first doctor's appointment, which will later result in the diagnosis of the disease (Sinaii *et al.* 2008, Moradi *et al.* 2014, Reis *et al.* 2019). As a matter of fact, endometriotic implants cause a local inflammatory reaction and enhance the proinflammatory mediators' levels, such as IL-1b, IL-6, TNFa and COX-2, generating a mechanism of inflammatory pain (Morotti *et al.* 2016). Besides that, a recent study showed that COX-2 is overexpressed in the ectopic endometrium of endometriosis patients, in comparison to the eutopic endometrium of women without the disease (Dai *et al.* 2019).

A few limitations can be pointed out: since most of the variables were self-reported, there is a chance of misclassification and, therefore, it can influence the results; as in every observational study, there is the possibility of unmeasured variables, which could be possible confounding factors; it is also observed that some variables have considerable missing information. In addition, it is not possible to state whether associations with the collected variables are the cause or consequence of endometriosis. However, the results can be used to build a database from different populations to identify risk factors associated with endometriosis susceptibility.

As conclusion, *PTGS2 -1195A>G* SNP was negatively associated with development of endometriosis, which represents an advance in endometriosis understanding and can assist diagnosis of the disease, as well as contribute to an individualized treatment, helping to provide a better quality of life for women. On the other hand, the *PTGS2 +8473T>C* SNP appears to have no effect on the onset of the disease. At last, further studies are needed to better know the role of *PTGS2* SNPs in the susceptibility of endometriosis and disease-associated symptoms.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank all staff members of the two recruitment hospitals (HFSE and HMF) for collaborating and allowing this study to happen, and our dear students Giuliana Rodrigues de Souza and Matheus Pereira de Mello for their technical assistance.

## **FUNDING**

This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

## REFERENCES

- Audebert, A., Lecointre, L., Afors, K., Koch, A., Wattiez, A. and Akladios, C., 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*, 22(5), pp.834-840.
- Awad, E., Ahmed, H., Yousef, A. and Abbas, R., 2017. Efficacy of exercise on pelvic pain and posture associated with endometriosis: within subject design. *Journal of Physical Therapy Science*, 29(12), pp.2112-2115.
- Backonja, U., Hediger, M., Chen, Z., Lauver, D., Sun, L., Peterson, C. and Buck Louis, G., 2017. Beyond Body Mass Index: Using Anthropometric Measures and Body Composition Indicators to Assess Odds of an Endometriosis Diagnosis. *Journal of Women's Health*, 26(9), pp.941-950.
- Bonoche, C., Montenegro, M., Rosa e Silva, J., Ferriani, R. and Meola, J., 2014. Endometriosis and physical exercises: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), p.4.
- Bravi, F., Parazzini, F., Cipriani, S., Chiaffarino, F., Ricci, E., Chiantera, V., Viganò, P. and La Vecchia, C., 2014. Tobacco smoking and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 4(12), p.e006325.
- Bukulmez, O., Hardy, D., Carr, B., Word, R. and Mendelson, C., 2008. Inflammatory Status Influences Aromatase and Steroid Receptor Expression in Endometriosis. *Endocrinology*, 149(3), pp.1190-1204.
- Burney, R. and Giudice, L., 2012. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), pp.511-519.
- Cardoso, J., Abrão, M., Vianna-Jorge, R., Ferrari, R., Berardo, P., Machado, D. and Perini, J., 2017. 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, pp.25-33.

- Cardoso, J., Machado, D., da Silva, M., Berardo, P., Ferrari, R., Abrão, M. and Perini, J., 2019. Matrix metalloproteinases 3 polymorphism increases the risk of developing advanced endometriosis and infertility: A case-control study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*: X, 3, p.100041.
- Cardoso, J., Machado, D., Ferrari, R., Silva, M., Berardo, P. and Perini, J., 2017. 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 e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*, 39(06), pp.273-281.
- Carrarelli, P., Luddi, A., Funghi, L., Arcuri, F., Batteux, F., Dela Cruz, C., Tosti, C., Reis, F., Chapron, C. and Petraglia, F., 2016. Urocortin and corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 mRNA are highly expressed in deep infiltrating endometriotic lesions. *Reproductive Biomedicine Online*, 33(4), pp.476-483.
- Cavalcanti, V., Ponce, T., Mafra, F., André, G., Christofolini, D., Barbosa, C. and Bianco, B., 2015. Evaluation of the frequency of G-765C polymorphism in the promoter region of the COX-2 gene and its correlation with the expression of this gene in the endometrium of women with endometriosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(1), pp.109-115.
- Chapron, C., Lang, J., Leng, J., Zhou, Y., Zhang, X., Xue, M., Popov, A., Romanov, V., Maissonobe, P. and Cabri, P., 2016. Factors and Regional Differences Associated with Endometriosis: A Multi-Country, Case–Control Study. *Advances in Therapy*, 33(8), pp.1385-1407.
- Chapron, C., Santulli, P., de Ziegler, D., Noel, J., Anaf, V., Streuli, I., Foulot, H., Souza, C. and Borghese, B., 2012. Ovarian endometrioma: severe pelvic pain is associated with deeply infiltrating endometriosis. *Human Reproduction*, 27(3), pp.702-711.
- Chishima, F., Hayakawa, S., Sugita, K., Kinukawa, N., Aleemuzzaman, S., NEMOTO, N., Yamamoto, T. and Honda, M., 2002. Increased Expression of Cyclooxygenase-2 in Local Lesions of Endometriosis Patients. *American Journal of Reproductive Immunology*, 48(1), pp.50-56.

- Dai, S., Zhu, M., Wu, R., Lin, D., Huang, Z., Ren, L., Huang, S., Cheng, L. and Chen, Q., 2019. Lipoxin A4 Suppresses IL-1 $\beta$ -Induced Cyclooxygenase-2 Expression Through Inhibition of p38 MAPK Activation in Endometriosis. *Reproductive Sciences*, 26(12), pp.1640-1649.
- Deiana, D., Gessa, S., Anardu, M., Daniilidis, A., Nappi, L., D'Alterio, M., Pontis, A. and Angioni, S., 2019. Genetics of endometriosis: a comprehensive review. *Gynecological Endocrinology*, 35(7), pp.553-558.
- Eisenberg, V., Weil, C., Chodick, G. and Shalev, V., 2017. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 125(1), pp.55-62.
- Evans, M. and Decherney, A., 2017. Fertility and Endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 60(3), pp.497-502.
- Farland, L., Missmer, S., Bijon, A., Gusto, G., Gelot, A., Clavel-Chapelon, F., Mesrine, S., Boutron-Ruault, M. and Kvaskoff, M., 2017. Associations among body size across the life course, adult height and endometriosis. *Human Reproduction*, 32(8), pp.1732-1742.
- Ferrero, S., Barra, F. and Leone Roberti Maggiore, U., 2018. Current and Emerging Therapeutics for the Management of Endometriosis. *Drugs*, 78(10), pp.995-1012.
- Hansen, K. and Eyster, K., 2010. Genetics and Genomics of Endometriosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(2), pp.403-412.
- Hemmert, R., Schliep, K., Willis, S., Peterson, C., Louis, G., Allen-Brady, K., Simonsen, S., Stanford, J., Byun, J. and Smith, K., 2018. Modifiable life style factors and risk for incident endometriosis. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 33(1), pp.19-25.
- Hemmings, R., Rivard, M., Olive, D., Poliquin-Fleury, J., Gagné, D., Hugo, P. and Gosselin, D., 2004. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 81(6), pp.1513-1521.
- Hruska, K., Furth, P., Seifer, D., Sharara, F. and Flaws, J., 2000. Environmental Factors in Infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 43(4), pp.821-829.

- Juo, S., Wu, R., Lin, C., Wu, M., Lee, J. and Tsai, E., 2009. A functional promoter polymorphism in interleukin-10 gene influences susceptibility to endometriosis. *Fertility and Sterility*, 92(4), pp.1228-1233.
- Kallner, H. and Danielsson, K., 2016. Prevention of unintended pregnancy and use of contraception—important factors for preconception care. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(4), pp.252-255.
- Kobayashi, H., Higashiura, Y., Shigetomi, H. and Kajihara, H., 2013. Pathogenesis of endometriosis: The role of initial infection and subsequent sterile inflammation (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9(1), pp.9-15.
- Koppan, A., Hamori, J., Vranics, I., Garai, J., Kriszbacher, I., Bodis, J., Rebek-Nagy, G. and Koppan, M., 2010. Pelvic pain in endometriosis: Painkillers or sport to alleviate symptoms?. *Acta Physiologica Hungarica*, 97(2), pp.234-239.
- Lai, Z., Yang, H., Ha, S., Chang, K., Mei, J., Zhou, W., Qiu, X., Wang, X., Zhu, R., Li, D. et al., 2019. Cyclooxygenase-2 in Endometriosis. *International Journal of Biological Sciences*, 15(13), pp.2783-2797.
- Matsuzaki, S., Canis, M., Pouly, J., Wattiez, A., Okamura, K. and Mage, G., 2004. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertility and Sterility*, 82(5), pp.1309-1315.
- Moore, A., Young, L. and Dixon, D., 2011. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene*, 31(12), pp.1592-1598.
- Moradi, M., Parker, M., Sneddon, A., Lopez, V. and Ellwood, D., 2014. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Women's Health*, 14(1).
- Morotti, M., Vincent, K. and Becker, C., 2017. Mechanisms of pain in endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 209, pp.8-13.
- Nnoaham, K., Hummelshoj, L., Webster, P., d'Hooghe, T., de Ciccio Nardone, F., de Ciccio Nardone, C., Jenkinson, C., Kennedy, S. and Zondervan, K., 2011. Impact of endometriosis on

quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertility and Sterility*, 96(2), pp.366-373.e8.

Parasar, P., Ozcan, P. and Terry, K., 2017. Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 6(1), pp.34-41.

Parazzini, F., Esposito, G., Tozzi, L., Noli, S. and Bianchi, S., 2017. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 209, pp.3-7.

Perini, J., Cardoso, J., Berardo, P., Vianna-Jorge, R., Nasciutti, L., Bellodi-Privato, M., Machado, D. and Abrão, M., 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 Women's Health*, 14(1).

Piranda, D., Festa-Vasconcellos, J., Amaral, L., Bergmann, A. and Vianna-Jorge, R., 2010. Polymorphisms in regulatory regions of Cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer*, 10(1).

Prince, M., Acosta, D., Guerra, M., Huang, Y., Jimenez-Velazquez, I., Llibre Rodriguez, J., Salas, A., Sosa, A., Chua, K., Dewey, M., et al., 2018. Reproductive period, endogenous estrogen exposure and dementia incidence among women in Latin America and China; A 10/66 population-based cohort study. *PLOS ONE*, 13(2), p.e0192889.

Ray, K., Fahrman, J., Mitchell, B., Paul, D., King, H., Crain, C., Cook, C., Golovko, M., Brose, S., Golovko, et al., 2015. Oxidation-sensitive nociception involved in endometriosis-associated pain. *PAIN*, 156(3), pp.528-539.

Reis, F., Santulli, P., Marcellin, L., Borghese, B., Lafay-Pillet, M. and Chapron, C., 2020. Superficial Peritoneal Endometriosis: Clinical Characteristics of 203 Confirmed Cases and 1292 Endometriosis-Free Controls. *Reproductive Sciences*, 27(1), pp.309-315.

- Ricci, E., Viganò, P., Cipriani, S., Chiaffarino, F., Bianchi, S., Rebonato, G. and Parazzini, F., 2016. Physical activity and endometriosis risk in women with infertility or pain. *Medicine*, 95(40), p.e4957.
- Riccio, L., Santulli, P., Marcellin, L., Abrão, M., Batteux, F. and Chapron, C., 2018. Immunology of endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 50, pp.39-49.
- Saha, R., Pettersson, H., Svedberg, P., Olovsson, M., Bergqvist, A., Marions, L., Tornvall, P. and Kuja-Halkola, R., 2015. Heritability of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 104(4), pp.947-952.
- Shafir, A., Farland, L., Shah, D., Harris, H., Kvaskoff, M., Zondervan, K. and Missmer, S., 2018. Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51, pp.1-15.
- Sinaii, N., Plumb, K., Cotton, L., Lambert, A., Kennedy, S., Zondervan, K. and Stratton, P., 2008. Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertility and Sterility*, 89(3), pp.538-545.
- Tanabe, T. and Tohnai, N., 2002. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69, pp.95-114.
- Wang, H., Sun, L., Jiang, M., Liu, L. and Wang, G., 2016. -1195 A/G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene increases the risk of pain occurrence in endometriotic women. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 43(2), pp.254-257.
- Wang, Y., Qu, Y. and Song, W., 2015. Genetic variation in COX-2 -1195 and the risk of endometriosis and adenomyosis. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 42(2), pp.168-172.
- Zhang, X., Miao, X., Tan, W., Ning, B., Liu, Z., Hong, Y., Song, W., Guo, Y., Zhang, X., Shen, Y., et al., 2005. Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology*, 129(2), pp.565-576.

Zolbin, M., Mamillapalli, R., Nematian, S., Goetz, L. and Taylor, H., 2019. Adipocyte alterations in endometriosis: reduced numbers of stem cells and microRNA induced alterations in adipocyte metabolic gene expression. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1).

Zondervan, K., Becker, C., Koga, K., Missmer, S., Taylor, R. and Viganò, P., 2018. Endometriosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1).

## 7. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenhado para avaliar o potencial papel SNPs *PTGS2* -1195A>G e +8473T> C no desenvolvimento da endometriose e caracterizar sua associação com as características prognósticas da doença. Três estudos avaliaram (JUO et al., 2009; WANG et al., 2015; WANG et al., 2016) o SNP *PTGS2* -1195A>G no desenvolvimento da endometriose, dos quais apenas dois encontraram uma associação significativa com a doença (WANG et al., 2015; WANG et al., 2016). Wang e cols. (2015) e Wang e cols. (2016), relataram uma frequência mais alta do genótipo *PTGS2* -1195AA em pacientes com endometriose, sugerindo um risco duas vezes maior para o desenvolvimento de doença (WANG et al., 2015; WANG et al., 2016). No presente estudo, também se observou uma maior frequência do genótipo *PTGS2* -1195AA no grupo endometriose (74,9%) em comparação ao grupo controle (72,2%). O alelo *PTGS2*-1195A é responsável por um aumento da atividade transcricional, por permitir que o fator de transcrição c-Myb se ligue à região promotora do gene *PTGS2* (ZHANG et al., 2005; WANG et al., 2016). Apesar da presença do alelo *PTGS2* + 8473T criar um local de ligação ao miR542-3p, promovendo a degradação do RNA mensageiro e diminuindo a expressão gênica (MOORE et al., 2012), nenhuma associação significativa foi observada entre o SNP *PTGS2* +8473T>C e o desenvolvimento da endometriose nem suas características prognósticas. Até onde sabemos, não existem outros estudos sobre a associação do SNP *PTGS2* +8473 T>C e o desenvolvimento de endometriose.

A endometriose é uma doença heterogênea que pode ser influenciada por fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais (DEIANA et al., 2019). Os estudos familiares destacam-se por sua capacidade de mostrar que a suscetibilidade genética desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Um estudo realizado em 2015 avaliou a contribuição relativa da genética no desenvolvimento da endometriose, através da análise de dados autorrelatados de endometriose em irmãs gêmeas dizigóticas e monozigotas. Os autores

observaram que a maior correlação entre pares foi encontrada entre os gêmeos monozigóticos, indicando que a contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da endometriose foi de 47% (SAHA et al., 2015). No presente estudo, a maioria das mulheres com histórico familiar de endometriose pertencia ao grupo de casos, o que corrobora com estudos anteriores (HANSEN e EYSTER, 2010; AUDEBERT et al., 2015; REIS et al., 2019).

Um risco menor de desenvolver endometriose foi observado em mulheres acima de 35 anos. Um estudo de revisão realizado em 2018 demonstrou que o pico de incidência de endometriose em mulheres de diferentes nacionalidades ocorre entre 25 e 34 anos, corroborando com nossos achados (SHAFRIR et al., 2018). Esses resultados endossam o fato de que a endometriose afeta mulheres em idade reprodutiva, o que está diretamente relacionado a altos níveis de estrogênio circulante durante esse período (PRINCE et al., 2018).

O uso de contraceptivos está entre as primeiras estratégias de tratamento para a endometriose (FERRERO et al., 2015; TAFI et al., 2015; FERRERO et al., 2018a), portanto, uma associação positiva desta variável com a presença da doença já era esperada. Além disso, pode-se observar que também há uma relação entre a presença da doença e maiores níveis de instrução, o que pode ser explicado pelo fato de que, hoje em dia, a tendência das mulheres é usar contraceptivos em idades mais precoces e, portanto, por períodos mais longos. Sendo assim, é comum que a maioria das mulheres descubra a endometriose apenas quando decidem engravidar (HRUSKA et al., 2000; HEMMINGGS et al., 2004), o que geralmente acontece após atingir níveis mais altos de educação (KALLNER e DANIELSSON, 2016).

Embora a associação entre endometriose e IMC ainda não esteja bem estabelecida (EISENBERG et al., 2018), nossos achados concordam com estudos anteriores que descreveram uma associação inversa entre endometriose e IMC (PERINI et al., 2014; CHAPRON et al., 2016; BACKONJA et al., 2017; REIS et al., 2019). Consequentemente, um estudo recente demonstrou que a endometriose altera a expressão de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos marrons, apetite, sensibilidade à insulina e metabolismo da gordura,

como leptina, adiponectina e IL-6, por meio de microRNAs circulantes que sabidamente estão alterados na endometriose (Let-7b e miR-342). Essa expressão alterada leva a células adiposas com metabolismo de lipídios e glicose alterados e propensão à menor massa gorda, o que pode ser uma explicação para o menor IMC observado em mulheres com endometriose (ZOLBIN et al., 2019).

Alguns estudos avaliaram a associação entre atividade física e risco de endometriose, encontrando resultados semelhantes aos nossos (FARLAND et al. 2017), entretanto, essa relação ainda não é clara (BONOCHE et al., 2014; SHAFRIR et al., 2018). Biologicamente, os níveis de estrogênio tendem a diminuir com a atividade física e a aumentar os níveis de globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG), reduzindo assim ainda mais estrogênios biodisponíveis (Ricci et al., 2016). No entanto, alguns estudos afirmam que essa prática ajuda a aliviar os sintomas de dor relacionados à endometriose (KOPPAN et al., 2010; AWAD et al., 2017), o que pode explicar por que, nessa amostra populacional específica, mulheres com endometriose eram mais propensas a praticar alguma atividade física. atividade. Dessa forma, não é possível afirmar se essas mulheres começaram a se exercitar para aliviar a dor ou se já possuíam esse hábito antes do diagnóstico de endometriose.

Os estudos disponíveis sobre a associação entre endometriose e tabagismo mostraram resultados controversos. Apesar de alguns estudos terem mostrado uma associação negativa entre tabagismo e endometriose (CHAPRON et al., 2016; BACKONJA et al., 2017; REIS et al., 2019), corroborando com nossos achados, outros estudos encontraram evidências de que o tabagismo é um fator de risco para endometriose (EVANS e DECHERNEY, 2017) ou que não existe nenhuma associação (BRAVI et al., 2014; HEMMERT et al., 2019). Sabe-se que o hábito de fumar prejudica a síntese de estradiol e progesterona, diminuindo os estrógenos circulantes em mulheres que fumam e inibindo o crescimento e a persistência do tecido endometriótico. No entanto, também afeta a expressão de genes pró-inflamatório nos ambientes pulmonar e extrapulmonar, promovendo eventos associados à inflamação, como a ocorrência de

endometriose (PARAZZINI et al., 2016; PARASAR et al., 2017).

No presente estudo, observou-se alta prevalência de dismenorreia, dor pélvica crônica, dispareunia, queixas intestinais ou urinárias cíclicas e infertilidade em pacientes com endometriose, quando comparadas aos controles. Os principais sintomas da endometriose estão bem estabelecidos e envolvem dor, sendo o motivo comum para a primeira consulta médica, que mais tarde resultará no diagnóstico da doença (SINAII et al., 2008; MORADI et al., 2014; REIS et al., 2019). De fato, os implantes endometrióticos causam uma reação inflamatória local e aumentam os níveis dos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1b, IL-6, TNF $\alpha$  e COX-2, gerando um mecanismo de dor inflamatória (MOROTTI et al., 2016). Além disso, um estudo recente mostrou que a COX-2 é superexpressa no endométrio ectópico de pacientes com endometriose, em comparação com o endométrio eutópico de mulheres sem a doença (DAI et al., 2019).

Algumas limitações do estudo podem ser apontadas: como a maioria das variáveis foi autorreferida, existe uma chance de classificação incorreta e, portanto, pode influenciar os resultados; como em todo estudo observacional, existe a possibilidade de variáveis não medidas, que podem ser possíveis fatores de confusão; também se observa que algumas variáveis têm considerável falta de informação. Além disso, não é possível afirmar se as associações com as variáveis coletadas são a causa ou consequência da endometriose. Entretanto, este foi o primeiro estudo a investigar a associação entre estes polimorfismos e o desenvolvimento da endometriose, bem como com suas características prognósticas na população brasileira. Com isso, estes resultados podem ser usados para construir um banco de dados de diferentes populações para identificar fatores de risco associados à suscetibilidade à endometriose.

## 8. CONCLUSÃO

Como conclusão, foram observadas diferenças significativas entres os grupos em relação a idade, IMC, nível educacional, atividade física, tabagismo, contracepção, histórico de endometriose e todos os sintomas. O SNP *PTGS2 -1195A>G* associou-se negativamente ao desenvolvimento da endometriose, o que representa um avanço no entendimento da doença e pode auxiliar no diagnóstico, além de contribuir para um tratamento individualizado, ajudando a proporcionar uma melhor qualidade de vida às pacientes. Por outro lado, o SNP *PTGS2 +8473T>C* parece não ter efeito no desenvolvimento da doença. Por fim, são necessários mais estudos para conhecer melhor o papel dos SNPs do *PTGS2* na suscetibilidade da endometriose e dos sintomas associados à doença.

## 9. REFERÊNCIAS

ABRÃO, Mauricio Simões. Endometriose: uma visão contemporânea. In: **Endometriose: uma visão contemporânea**. 2000. p. 278-278.

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 Simoes et al. Endometriosis lesions that compromise the rectum deeper than the inner muscularis layer have more than 40% of the circumference of the rectum affected by the disease. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 15, n. 3, p. 280-285, 2008.

AHN, Soo Hyun et al. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. **Fertility and sterility**, v. 106, n. 6, p. 1420-1431. e7, 2016.

ANDERSON, George. Endometriosis pathoetiology and pathophysiology: Roles of vitamin A, estrogen, immunity, adipocytes, gut microbiome and melatonergic pathway on mitochondria regulation. **Biomolecular concepts**, v. 10, n. 1, p. 133-149, 2019.

ANIFANTAKI, Foteini et al. Association of endometriosis and breast cancer: mini review of the literature. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 293, n. 1, p. 5-10, 2016.

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

ATTAR, E.; BULUN, Serdar E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. **Human reproduction update**, v. 12, n. 1, p. 49-56, 2006.

AUDEBERT, Alain et al. Adolescent endometriosis: report of a series of 55 cases with a focus on clinical presentation and long-term issues. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 22, n. 5, p. 834-840, 2015.

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.

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

BOZDAG, Gurkan. Recurrence of endometriosis: risk factors, mechanisms and biomarkers. **Women's Health**, v. 11, n. 5, p. 693-699, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher: princípios e diretrizes. 2004. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nac\\_atencao\\_mulher.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nac_atencao_mulher.pdf)>. Acesso em: 17 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 879, de 12 de julho de 2016. Disponível em: <<https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/15/MINUTA-de-Portaria-SAS-PCDT-Endometriose-05-07-2016-ATUALIZA----O.pdf>>. Acesso em : 17 mar. 2020.

BRAVI, Francesca et al. Tobacco smoking and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v. 4, n. 12, p. e006325, 2014.

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.

BROSENS, Ivo; GORDTS, S.; BENAGIANO, G. Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2026-2031, 2013.

BUKULMEZ, Orhan et al. Inflammatory status influences aromatase and steroid receptor

expression in endometriosis. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1190-1204, 2008.

BURNEY, R.O.; GIUDICE, L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**, Tacoma, v.98, n.3, p. 511-519, 2012.

BUSACCA, Mauro et al. Determinants of long-term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 195, n. 2, p. 426-432, 2006.

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, 2016.

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, 2017.

CARDOSO, Jéssica Vilarinho et al. 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 e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 39, n. 06, p. 273-281, 2017b.

CARDOSO, Jéssica Vilarinho et al. Role of cytochrome P450 2C19 polymorphisms and body mass index in endometriosis: A case-control study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 219, p. 119-123, 2017c;

CARDOSO, Jéssica V. et al. Matrix metalloproteinases 3 polymorphism increases the risk of developing advanced endometriosis and infertility: A case-control study. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology: X**, v. 3, p. 100041, 2019.

CARRARELLI, Patrizia et al. Urocortin and corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 mRNA are highly expressed in deep infiltrating endometriotic lesions. **Reproductive biomedicine online**, v. 33, n. 4, p. 476-483, 2016.

CHAÂBOUNI, S. et al. Unusual cause of intestinal obstruction: ileal

endometriosis. **Pathologica**, v. 101, n. 3, p. 130-132, 2009.

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.

CHISHIMA, Fumihisa et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in local lesions of endometriosis patients. **American journal of reproductive immunology**, v. 48, n. 1, p. 50-56, 2002.

COK, Steven J.; MORRISON, Aubrey. Erratum: The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency (Journal of Biological Chemistry (2001) 276 (23179-23185)). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, 2001.

DEIANA, Danilo et al. Genetics of endometriosis: a comprehensive review. **Gynecological Endocrinology**, v. 35, n. 7, p. 553-558, 2019.

DE LA TORRE, Manuel Antonio López et al. Ten principles for safe surgical treatment of ovarian endometriosis. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 24, n. 2, p. 203-204, 2017.

DONG, X. et al. Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis. **Indian journal of cancer**, v. 51, n. 7, p. 72, 2014.

EISENBERG, V. H. et al. Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 125, n. 1, p. 55-62, 2018.

EVANS, M. Blake; DECHERNEY, Alan H. Fertility and endometriosis. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 60, n. 3, p. 497-502, 2017.

FALCONE, Tommaso; HURD, William W. (Ed.). **Clinical reproductive medicine and surgery: a practical guide**. Springer, 2017.

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.

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; BARRA, Fabio; MAGGIORE, Umberto Leone Roberti. Current and emerging therapeutics for the management of endometriosis. **Drugs**, v. 78, n. 10, p. 995-1012, 2018a.

FERRERO, Simone; EVANGELISTI, Giulio; BARRA, Fabio. Current and emerging treatment options for endometriosis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1109-1125, 2018b.

FESTA-VASCONCELLOS, Juliana S. et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. **Breast cancer research and treatment**, v. 132, n. 1, p. 251-258, 2012.

FLORES, Idhaliz et al. Noninvasive diagnosis of endometriosis: Review of current peripheral blood and endometrial biomarkers. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 50, p. 72-83, 2018.

FURUYA, Tatiane K. et al. Association between Polymorphisms in Inflammatory Response-Related Genes and the Susceptibility, Progression and Prognosis of the Diffuse Histological Subtype of Gastric Cancer. **Genes**, v. 9, n. 12, p. 631, 2018.

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

GRIFFITHS, Anthony J. F., WESSLER, Susan R., LEWONTIN, Richard C., CARROL, Sean B. *Introdução à Genética*. 9 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HANSEN, Keith A.; EYSTER, Kathleen M. Genetics and genomics of endometriosis. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 53, n. 2, p. 403, 2010.

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.

HEMMERT, Rachael et al. Modifiable life style factors and risk for incident endometriosis. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2019.

HEMMINGS, Robert et al. Evaluation of risk factors associated with endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 81, n. 6, p. 1513-1521, 2004.

HRUSKA, Kathleen S. et al. Environmental factors in infertility. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 43, n. 4, p. 821-829, 2000.

IRUNGU, Stella et al. Discovery of non-invasive biomarkers for the diagnosis of endometriosis. **Clinical proteomics**, v. 16, n. 1, p. 14, 2019.

ITO, Traci E. et al. Magnetic resonance imaging correlation to intraoperative findings of deeply infiltrative endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 2, p. e11-e12, 2017.

JIANG, Hua et al. Association between COL11A1 (rs1337185) and ADAMTS5 (rs162509) gene polymorphisms and lumbar spine pathologies in Chinese Han population: an observational study. **BMJ open**, v. 7, n. 5, p. e015644, 2017.

JOSEPH, Shaini; MAHALE, Smita D. Endometriosis Knowledgebase: a gene-based resource on endometriosis. **Database**, v. 2019, 2019.

JUO, Suh-Hang Hank et al. A functional promoter polymorphism in interleukin-10 gene influences susceptibility to endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 4, p. 1228-1233, 2009.

KALLNER, Helena Kopp; DANIELSSON, Kristina Gemzell. Prevention of unintended pregnancy and use of contraception—important factors for preconception care. **Upsala journal of medical sciences**, v. 121, n. 4, p. 252-255, 2016.

KEMILÄINEN, Heidi et al. The expression of HSD17B12 is associated with COX-2 expression and is increased in high-grade epithelial ovarian cancer. **Oncology**, v. 94, n. 4, p. 233-242, 2018.

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.

KHO, Rosanne M. et al. Surgical treatment of different types of endometriosis: comparison of major society guidelines and preferred clinical algorithms. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, v. 51, p. 102-110, 2018.

KIM, Hye Yeon et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene-765G/C Polymorphism and Advanced-Stage Endometriosis in Korean Women. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 68, n. 3, p. 238-243, 2012.

KOBAYASHI, Hiroshi et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of initial infection and subsequent sterile inflammation. **Molecular medicine reports**, v. 9, n. 1, p. 9-15, 2014.

KONINCKX, Philippe R. et al. Pathogenesis of endometriosis: the genetic/epigenetic theory. **Fertility and sterility**, v. 111, n. 2, p. 327-340, 2019.

KÜCHLER, Erika Calvano et al. Genetic polymorphisms influence gene expression of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. **Odontology**, p. 1-10, 2019.

KUMARI, Suchitra. Serum biomarker based algorithms in diagnosis of ovarian cancer: a review. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 382-386, 2018.

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, 2012.

LAI, Zhen-Zhen et al. Cyclooxygenase-2 in Endometriosis. **International Journal of**

**Biological Sciences**, v. 15, n. 13, p. 2783, 2019.

LIN, R. P.; YAO, C. Y.; REN, D. X. Association between genetic polymorphisms of PTGS2 and glioma in a Chinese population. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 2, p. 3142-3148, 2015.

MAGGIORE, Umberto Leone Roberti et al. Bladder endometriosis: a systematic review of pathogenesis, diagnosis, treatment, impact on fertility, and risk of malignant transformation. **European urology**, v. 71, n. 5, p. 790-807, 2017.

MAIA JR, Hugo; CASOY, Julio; VALENTE FILHO, Jorge. Is aromatase expression in the endometrium the cause of endometriosis and related infertility?. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 4, p. 253-257, 2009.

MAIA JR, Hugo et al. Role of inflammation and aromatase expression in the eutopic endometrium and its relationship with the development of endometriosis. **Women's Health**, v. 8, n. 6, p. 647-658, 2012.

MALUTAN, Andrei M. et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis. **Central-European journal of immunology**, v. 40, n. 1, p. 96, 2015.

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.

MATSUZAKI, Sachiko et al. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. **Fertility and sterility**, v. 82, n. 5, p. 1309-1315, 2004.

MAY, K. E. et al. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. **Human reproduction update**, v. 17, n. 5, p. 637-653, 2011.

MEULEMAN, Christel et al. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 68-74, 2009.

MODUGNO, Francesmary et al. Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 12, p. 2840-2847, 2005.

MOORE, A. E.; YOUNG, L. E.; DIXON, D. A. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. **Oncogene**, v. 31, n. 12, p. 1592-1598, 2012.

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.

MOROTTI, Matteo; VINCENT, Katy; BECKER, Christian M. Mechanisms of pain in endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 209, p. 8-13, 2017.

MOTA, Igor Leonardo Padovesi et al. Appendiceal nodules in the setting of endometriosis can be carcinoid tumors. **JSLs: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons**, v. 19, n. 3, 2015.

NACUL, Andrea Prestes; SPRITZER, Poli Mara. Current aspects on diagnosis and treatment of endometriosis. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, v. 32, n. 6, p. 298-307, 2010.

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.

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.

PAN, Yan et al. The genetic variant of COX-2 acts as a potential risk factor of colorectal cancer: evidence from a meta-analysis based on 13461 individuals. 2015.

PAPAFILI, Anastasia et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 10, p. 1631-1636, 2002.

PARASAR, Parveen; OZCAN, Pinar; TERRY, Kathryn L. Endometriosis: epidemiology, diagnosis and clinical management. **Current obstetrics and gynecology reports**, v. 6, n. 1, p. 34-41, 2017.

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

PARAZZINI, Fabio et al. Determinants of short term recurrence rate of endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 121, n. 2, p. 216-219, 2005.

PARAZZINI, F. et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 209, p. 3-7, 2016.

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.

PIRANDA, Diogo N. et al. Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 613, 2010.

PIRANDA, D. N. et al. Modulation of the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene expression by variant haplotypes: influence of the 3'-untranslated region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 2, 2018.

PODGAEC, S. Manual de Endometriose: 2014/2015. **São Paulo, SP: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia**, 2014.

PRINCE, Martin J. et al. Reproductive period, endogenous estrogen exposure and dementia incidence among women in Latin America and China; A 10/66 population-based cohort study. **PloS one**, v. 13, n. 2, 2018.

RAFIQUE, Saima; DECHERNEY, Alan H. Medical management of endometriosis. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 60, n. 3, p. 485, 2017.

RAY, Kristeena et al. Oxidation Sensitive Nociception Involved in Endometriosis Associated Pain. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 528, 2015.

REDWINE, David Byron. Was Sampson wrong?. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 4, p. 686-693, 2002.

REIS, Fernando M. et al. Superficial Peritoneal Endometriosis: Clinical Characteristics of 203 Confirmed Cases and 1292 Endometriosis-Free Controls. **Reproductive Sciences**, p. 1-7, 2019.

RICCIO, Luiza da Gama Coelho et al. Immunology of endometriosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 50, p. 39-49, 2018.

ROGERS, Peter AW et al. Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 4, p. 335-346, 2009.

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.

SACCO, Keith et al. The role of prostaglandin E2 in endometriosis. **Gynecological Endocrinology**, v. 28, n. 2, p. 134-138, 2012.

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

952, 2015.

SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.3, p.93-110, 1927.

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.

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.

SINGH, Sukhbir S.; SUEN, Michael WH. Surgery for endometriosis: beyond medical therapies. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 3, p. 549-554, 2017.

SMITH, William L.; DEWITT, David L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2. In: **Advances in immunology**. Academic Press, 1996. p. 167-215.

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.

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

TAYLOR, Robert N. et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. **Reproductive sciences**, v. 16, n. 2, p. 140-146, 2009.

TORRICELLI, Federica et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene in endometrial cancer patients. **Tumor Biology**, v. 36, n. 10, p. 7423-7430, 2015.

ULRICH, Cornelia M.; BIGLER, Jeannette; POTTER, John D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 2, p. 130-140, 2006.

VIGNALI, Michele et al. Surgical treatment of deep endometriosis and risk of recurrence. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 12, n. 6, p. 508-513, 2005.

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

VOGEL, Lotte K. et al. Intestinal PTGS2 mRNA levels, PTGS2 gene polymorphisms, and colorectal carcinogenesis. **PloS one**, v. 9, n. 8, 2014.

WANG, H. et al. -1195 A/G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene increases the risk of pain occurrence in endometriotic women. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 43, n. 2, p. 254-257, 2016.

WANG, Y.; QU, Y.; SONG, W. Genetic variation in COX-2-1195 and the risk of endometriosis and adenomyosis. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 42, n. 2, p. 168-172, 2015.

WANG, Yeh; NICHOLS, Kristen; SHIH, Ie-Ming. The origin and pathogenesis of endometriosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, 2019.

WU, Meng-Hsing et al. Prostaglandin E2: the master of endometriosis?. **Experimental biology and medicine**, v. 235, n. 6, p. 668-677, 2010.

ZHANG, Tiancheng et al. Association between COX-2 polymorphisms and non-small cell lung cancer susceptibility. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 3, p. 3168, 2015.

ZHANG, Xuemei et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 565-576, 2005.

ZHENG, Weilin et al. Anti-angiogenic alternative and complementary medicines for the treatment of endometriosis: a review of potential molecular mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

ZHOU, Wen-Jie et al. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 11, p. 2111-2132, 2019.

## 10. ANEXOS

### 10.1. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO 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.

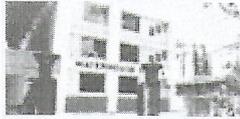
Assunto: Aprovação do Protocolo CEP: 000.414.

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:

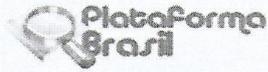
- 1- atentar para as recomendações contidas no Parecer Consubstanciado do CEP-HFSE;
- 2- observar que qualquer outra nova pesquisa utilizando o material biológico armazenado ou os dados obtidos dos sujeitos de pesquisa, necessitarão da elaboração de um novo protocolo de pesquisa com aprovação do CEP-HFSE, 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

## 10.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO 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

#### Apresentação do Projeto:

Vide parecer anterior.

#### Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer anterior.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer anterior.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os questionamentos feitos no parecer anterior foram respondidos a contento e, com os esclarecimentos prestados, nada há o que mais indagar.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram adequadamente apresentados.

#### Recomendações:

Não há.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

**Endereço:** Rua das Laranjeiras, 180

**Bairro:** Laranjeiras

**CEP:** 22.240-003

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2556-9747

**Fax:** (21)2205-9064

**E-mail:** cep@me.ufrj.br



MATERNIDADE ESCOLA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



Continuação 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)

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-003

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2556-9747

Fax: (21)2205-9064

E-mail: cep@me.ufrj.br

### 10.3. 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. Plínio 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 assegurado 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

## 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

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.

**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****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. Plínio 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. Plínio Tostes Berardo - Pesquisador responsável

**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****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 Plínio 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: \_\_\_\_\_

## 10.4. 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 mulheres com diagnóstico positivo ou negativo da doença, tendo o



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



Hospital Moncorvo Filho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



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: \_\_\_\_\_



**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) Diu (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
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

(Norelone, Diane 35, Femane, Tiquilar, Microdiol, Tmcondiol, Gynem, Seicre, Yasmin, Yao, Qlaira, Perfutan/Mesygina, Depo-provera, Mirena, NuvaRing)

**E19 - Você utilizou anticoncepcional via oral ou injetável por qual motivo?**  
 (0) Nunca usei (1) Contracepção (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:



<b>E22</b>	<b>Você sente ou sentia cólicas menstruais (dismenorréia)?</b>  Escala de dor nº _____	(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.
<b>E23</b>	<b>Você sente cólicas que não apresentam relação nenhuma com o seu ciclo menstrual (Dor Pélvica)?</b>  Escala de dor nº _____	(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.
<b>E24</b>	<b>Você sente ou sentia dor durante o ato sexual (dispareunia)?</b>	(0) Não (1) Na penetração (2) De profundidade (Dor no fundo da vagina) - Escala de dor nº _____
<b>E25</b>	<b>Você sente alterações intestinais relacionadas com a menstruação?</b>	(0) Não (1) Dor - Escala de dor nº _____ (2) Sangramento (3) Intestino Solto (4) Intestino Preso
<b>E26</b>	<b>Você sente alterações urinárias relacionadas com a menstruação?</b>	(0) Não (1) Dor - Escala de dor nº _____ (2) Sangramento (3) Aumento da frequência
<b>E27</b>	<b>Qual o principal sintoma que a incomoda?</b>	(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 (2) Pai (3) irmã (4) irmão (5) filha (6) filho (7) Tia Materna sanguínea (8) Tio Materno sanguínea (9) Tia Paterna sanguínea (10) Tio Paterno sanguínea (11) Avó Paterna (12) Avó Paterno (13) Avó Materna (14) Avó 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

**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?	Nº 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, avós) 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 capira		_ _	_	_ _
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	Cafê		___	___	___
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

(2) Uma vez por semana

(4) Diariamente

(1) Ocasionalmente

(3) Uma vez por mês

**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)Licore (5)Whisky ou Vodka	___	___
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licore (5)Whisky ou Vodka	___	___
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licore (5)Whisky ou Vodka	___	___
(1)Cerveja (2)Vinho (3)Cachaça (4)Licore (5)Whisky ou Vodka	___	___

#### 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
	___	___	___
	___	___	___
	___	___	___

#### 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: \_\_\_\_\_

## 10.6. CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

18/03/2020

ScholarOne Manuscripts

 **Reproduction**
 **Home**
 **Author**
 **Review**

# Submission Confirmation

 **Print**

Thank you for your submission

**Submitted to**  
Reproduction

**Manuscript ID**  
REP-20-0157

**Title**  
PTGS2 -1195A>G polymorphism was associated with lower risk of endometriosis

**Authors**  
da Silva, Mayara  
Machado, Daniel  
Cardoso, Jéssica  
Freitas-Alves, Daniely  
Costa, Isabelle  
Berardo, Plínio  
Ferrari, Renato  
Sabrao, Mauricio  
Vianna-Jorge, Rosane  
Perini, Jamila Alessandra

**Date Submitted**  
18-Mar-2020

[Author Dashboard](#)

---

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2020. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)